

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0609797-9 A2**



* B R P I O 6 0 9 7 9 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 19/05/2006
(43) Data da Publicação: 27/04/2010
(RPI 2051)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/36 (2010.01)
A61K 38/36 (2010.01)

(54) Título: **NANOCORPOS MELHORADOS PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS MEDIADAS POR AGREGAÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 20/05/2005 US 60/683,474

(73) Titular(es): Ablynx N.V.

(72) Inventor(es): KAREN SILENCE

(74) Procurador(es): Veirano e Advogados Associados

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006004773 de 19/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/122825 de 23/11/2006

(57) **Resumo:** NANOCORPOS MELHORADOS PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS MEDIADAS POR AGREGAÇÃO. A presente invenção se relaciona a nanocorpos melhorado contra o Fator de von Willebrand (vWF), bem como a polipeptídios compreendendo ou essencialmente compostos de um ou vários de tais nanocorpos. A invenção também se refere a ácidos nucleicos que codificam tais nanocorpos e polipeptídios; a métodos para preparar tais nanocorpos e polipeptídios; apresentar células que expressam ou são capazes de expressar tais nanocorpos ou polipeptídios, a composições que compreendem tais nanocorpos, polipeptídios, ácidos nucleicos ou células hospedeiras; e a usos de tais nanocorpos, tais polipeptídios, tais ácidos nucleicos, tais células hospedeiras ou tais composições, especialmente para objetivos profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos, como objetivos profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos.

**NANOCORPOS MELHORADOS PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS
MEDIADAS POR AGREGAÇÃO**

A presente invenção relaciona a nanocorpos[™] melhorado
5 contra o Fator de von Willebrand (vWF), bem como à
polipeptídios compreendendo ou essencialmente compostos de
um ou vários de tais nanocorpos. [Observação: Nanocorpo(s)
se referem a Nanobody[™], Nanobodies[™] e Nanoclone [™], que são
marcas registradas da Ablynx N.V.]

10 A invenção também se refere aos ácidos nucleicos que
codificam tais nanocorpos e polipeptídios; a métodos para
preparar tais nanocorpos e polipeptídios; apresentar células
que expressam ou são capazes de expressar tais nanocorpos ou
polipeptídios; a composições que compreendem tais
15 nanocorpos, polipeptídios, ácidos nucleicos ou células
hospedeiras; e a usos de tais nanocorpos, tais
polipeptídios, tais ácidos nucleicos, tais células
hospedeiras ou tais composições, especialmente para
objetivos profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos, como
20 objetivos profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos
mencionados mais adiante.

Outros aspectos, modalidades de execução, vantagens e
aplicações da invenção ficarão claros da nova descrição a
seguir.

25 O WO 04/062551 do Solicitante relaciona a nanocorpos
contra o Fator de von Willebrand (vWF) e à preparação e uso
do mesmo, especialmente para a prevenção e/ou o tratamento

de doenças e desordens que se relacionam com agregação mediada por plaqueta.

O nanocorpos anti-vWF segundo o WO 04/062551 pode ser humanizado e pode ser monovalente ou multivalente, o último
5 do qual leva à afinidade aumentada para vWF. O nanocorpos anti-vWF segundo o WO 04/062551 também pode ser multiespecífico, e ser especialmente na forma de um construto multiespecífico compreendendo dois ou mais nanocorpos contra vWF e um novo nanocorpo dirigido contra
10 uma proteína de soro como albumina de soro humana, que leva a uma meia-vida aumentada in vivo.

Os nanocorpos anti-vWF descritos em WO 04/062551 podem ser dirigidos contra qualquer epítopo ou a conformação de vWF (como o domínio de A1 ou domínio A3), mas são
15 preferivelmente dirigidos contra o domínio de A1, e especialmente contra a conformação ativada do domínio A1.

O WO 04/062551 também descreve a preparação do nanocorpos anti-vWF, seqüências de nucleotídeos que codificam o nanocorpos anti-vWF, bem como composições
20 farmacêuticas que compreendem o nanocorpos anti-vWF.

O nanocorpos anti-vWF e composições descritas em WO 04/062551 pode ser usado para a prevenção e o tratamento de doenças e desordens relacionadas à agregação mediada por plaqueta, como a formação de um trombo não-oclusivo, a
25 formação de um trombo oclusivo, formação trombo arterial, oclusão coronária aguda, doença oclusiva arterial periférica, restenose e desordens que resultam de enxerto de

desvio coronário, substituição de válvula de artéria coronária e intervenções coronárias tais como angioplastia, stenting ou aterectomia, hiperplasia depois angioplastia, aterectomia ou stenting arterial, síndrome oclusiva em um sistema vascular ou a falta de revelação de artérias de doente, púrpura trombótica trombocitopénica (TTP), ataque de isquemia cerebral transiente, angina pectoris estável ou instável, enfarte cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomia carótida, estenose da artéria carótida, isquemia do limbo crítico, cardioembolismo, doença vascular periférica, restenose e enfarte do miocárdio..

As composições farmacêuticas descritas em WO 04/062551 podem ser convenientes para a administração intravenosa, subcutânea, oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal ou retal, ou para administração pela inalação; e também pode compreender um agente trombolítico, como estafiloquinase, ativador plasminogênico de tecido, estreptoquinase, estreptoquinase de cadeia única, uroquinase e complexo de estreptoquinase acil plasminogênico. O nanocorpos anti-vWF descritos em WO 04/062551 também pode ser usado para objetivos de diagnósticos (opcionalmente na forma de um kit-de-partes) ou em revestimentos para dispositivos médicos como stents.

Ele é um objeto geral da presente invenção de fornecer nanocorpos contra vWF, especialmente contra vWF humano.

Especialmente, é um objeto da presente invenção fornecer nanocorpos contra vWF, especialmente contra vWF

humano, e fornecer proteína ou polipeptídios que compreendam os mesmos, que sejam convenientes para o uso terapêutico e/ou diagnóstico, e especialmente para a prevenção, tratamento e/ou diagnóstico de uma ou várias doenças e desordens associadas com e/ou mediadas por vWF como as acima mencionados, e/ou que pode ser usado na preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de uma ou várias doenças associadas com e/ou mediadas por vWF, como os acima mencionados.

10 Mais especialmente, é um objeto da invenção fornecer nanocorpos contra vWF, e fornecer proteína e polipeptídios que compreendam os mesmos, que são qualquer uma alternativa ao nanocorpos e polipeptídios contra vWF descritos em WO 04/062551 e/ou que tem uma ou várias propriedades ou características melhoradas, em comparação com os nanocorpos e polipeptídios contra vWF descrito em WO 04/062551.

Mais especialmente, é um objeto da invenção fornecer nanocorpos contra vWF, e fornecer proteína ou polipeptídios que compreendam os mesmos, que são melhorados em comparação com os nanocorpos e polipeptídios contra vWF descrito em WO 04/062551 com respeito a uma ou várias das propriedades ou características seguintes:

25 - afinidade aumentada para vWF, seja em um formato monovalente, em um formato multivalente (por exemplo, em um formato bivalente) e/ou em um formato multiespecífico (por exemplo, um dos formatos multiespecíficos descritos em WO 04/062551 ou a seguir);

- melhor conveniência para formatação em um formato multivalente (por exemplo, em um formato bivalente);
- melhor conveniência para formatação em um formato multiespecífico (por exemplo, um dos formatos multiespecíficos descritos em WO 04/062551 ou a seguir);
- conveniência melhorada ou suscetibilidade que "humaniza" substituições (como definido neste lugar); e/ou
- menos imunogenicidade, seja em um formato monovalente, em um formato multivalente (por exemplo, em um formato bivalente) e/ou em um formato multiespecífico (por exemplo, um dos formatos multiespecíficos descritos em WO 04/062551 ou a seguir) em um formato monovalente;
- estabilidade aumentada, seja em um formato monovalente, em um formato multivalente (por exemplo, em um formato bivalente) e/ou em um formato multiespecífico (por exemplo, um dos formatos multiespecíficos descritos em WO 04/062551 ou a seguir) em um formato monovalente;
- especificidade aumentada em direção a vWF, seja em um formato monovalente, em um formato multivalente (por exemplo, em um formato bivalente) e/ou em um formato multiespecífico (por exemplo, um dos formatos multiespecíficos descritos em WO 04/062551 ou a seguir) em um formato monovalente;
- reduzido ou onde desejado reatividade cruzada aumentada com vWF de espécie diferente;
- e/ou
- uma ou várias outras propriedades melhoradas

desejáveis para uso farmacêutico (inclusive uso profilático e/ou uso terapêutico) e/ou uso para diagnóstico (inclusive, mas não limitado a, usar para objetivos de visualização), seja em um formato monovalente, em um formato multivalente 5 (por exemplo, em um formato bivalente) e/ou em um formato multiespecífico (por exemplo, um dos formatos multiespecíficos descritos em WO 04/062551 ou a seguir).

Esses objetos são realizados pelo nanocorpos contra vWF e pelos polipeptídios descritos na presente. Os 10 nanocorpos contra vWF e polipeptídios descritos na presente são especialmente dirigidos contra vWF humano, mas está incluído dentro dos limites da invenção que alguns nanocorpos anti-vWF e os polipeptídios da invenção podem mostrar reatividade cruzada com vWF de outros animais 15 vertebrados, especialmente de outros animais de sangue quente, mais especialmente de outros mamíferos, e especialmente de outra espécie de primatas, como os babuínos usados nos Exemplos mais adiante. Contudo, como com nanocorpos anti-vWF descritos em WO 04/062551, a presente 20 invenção no seu sentido mais amplo não é em particular limitada a ou definida por um epítope específico, domínio ou confirmação de vWF contra o qual os nanocorpos e os polipeptídios da invenção são dirigidos. Contudo, é geralmente assumido e preferido que os nanocorpos e os 25 polipeptídios da invenção sejam dirigidos contra um domínio 1 de vWF, na sua confirmação ativada ou não-ativada.

Portanto, em um primeiro aspecto, a invenção refere-se

a um nanocorpo (conforme definido na presente), contra vWF, que se compõem de 4 regiões de armação (FR'S I a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), em que:

5 i) O CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se de uma seqüência aminoácida escolhida de grupo composto de :

NYGMG [SEQ ID n. 15]

SYTLG [SEQ ID n. 16]

NYNMG [SEQ ID n. 17]

10 SSAMA [SEQ ID n. 18]

YYNTG [SEQ ID n. 19]

IGAMG [SEQ ID n. 20]

IGTMG [SEQ ID n. 21]

YNPMG [SEQ ID n. 22]

15 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima
20 mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
25 contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas,

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

5 (1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
10 inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

ii) O CDR2 compreende ou essencialmente compoe-se de uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de:

15 SISWSGTYTAYSDNVKG [SEQ ID n. 23]
GISWSGVSTDYAEFAKG [SEQ ID n. 24]
TSISWSGSYTAYADNVKG [SEQ ID n. 25]
SISWSGMSTYYTDSVKG [SEQ ID n. 26]
TITSGGRTSYADSVKG [SEQ ID n. 27]
20 AISWSGGLTYADSVKG [SEQ ID n. 28]
TITSGGSTNYADPVKG [SEQ ID n. 29]
TITSGGSTNYADSVKG [SEQ ID n. 30]
AISRTGGSTYYARSVEG [SEQ ID n. 31]
AISRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID n. 32]

25 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente

pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

iii) O CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se de uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

QSRYRSNYYDHDDKYAY [SEQ ID n. 33]

LGRYRSNWRNIGQYDY [SEQ ID n. 34]

	QSRYSSNYYDHDDKYAY	[SEQ ID n. 35]
	SNRYRTHTTQAMYNY	[SEQ ID n. 36]
	VVDGKRAP	[SEQ ID n. 37]
	NRRQKTIVQMGERAYDY	[SEQ ID n. 38]
5	NLKQGSYGYRFNDY	[SEQ ID n. 39]
	NLKQGDYGYRFNDY	[SEQ ID n. 40]
	AGVRAEDGRVRTLPSEYNF	[SEQ ID n. 41]
	AGVRAEDGRVRTLPSEYTF	[SEQ ID n. 42]
	AGVRAEDGRVRSLPSEYTF	[SEQ ID n. 43]

10 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima
15 mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
20 contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
25 definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente

uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um nanocorpo (conforme definido na presente), contra

os vWF, que se compõem de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), em que:

i) O CDR1 é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

	NYGMG	[SEQ ID n. 15]
15	SYTLG	[SEQ ID n. 16]
	NYNMG	[SEQ ID n. 17]
	SSAMA	[SEQ ID n. 18]
	YYNTG	[SEQ ID n. 19]
	IGAMG	[SEQ ID n. 20]
20	IGTMG	[SEQ ID n. 21]
	YNPMG	[SEQ ID n. 22]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos

Identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima

mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

5 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
10 têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
15 na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

20 e em que:

ii) O CDR2 é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

SISWSGTYTAYSDNVKG [SEQ ID n. 23]

GISWSGVSTDYAEFAKG [SEQ ID n. 24]

25 TSISWSGSYTAYADNVKG [SEQ ID n. 25]

SISWSGMSTYYTDSVKG [SEQ ID n. 26]

TITSGGRTSYADSVKG [SEQ ID n. 27]

AISWSGGLTYADSVKG [SEQ ID n. 28]

TITSGGSTNYADPVKG [SEQ ID n. 29]

TITSGGSTNYADPVKG [SEQ ID n. 30]

AISRTGGSTYYARSVEG [SEQ ID n. 31]

5 AISRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID n. 32]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

15 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que 20 têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

25 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou

inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

iii) O CDR3 é uma seqüência aminoácida escolhida
5 do grupo composto de :

	QSRYSNYYDHDDKYAY	[SEQ ID n. 33]
	LGRYSNWRNIGQYDY	[SEQ ID n. 34]
	QSRYSNYYDHDDKYAY	[SEQ ID n. 35]
	SNRYRTHTTQAMYNY	[SEQ ID n. 36]
10	VVDGKRAP	[SEQ ID n. 37]
	NRRQKTVQMGERAYDY	[SEQ ID n. 38]
	NLKQGSYGYRFNDY	[SEQ ID n. 39]
	NLKQGDYGYRFNDY	[SEQ ID n. 40]
	AGVRAEDGRVRTLPSEYNF	[SEQ ID n. 41]
15	AGVRAEDGRVRTLPSEYTF	[SEQ ID n. 42]
	AGVRAEDGRVRS LPSEYTF	[SEQ ID n. 43]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente
20 pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
25 na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou

inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

Os nanocorpos contra vWF conforme descrito anteriormente e conforme adicionalmente descrito a seguir também são mencionados na presente como nanocorpos da invenção.

Do nanocorpos da invenção, nanocorpos que compreendem um ou vários do CDR'S explicitamente enumerado anteriormente são em particular preferidos; os nanocorpos compreensão de dois ou mais do CDR'S explicitamente enumerado anteriormente são mais em particular preferidos; e os nanocorpos compreensão de três do CDR'S explicitamente enumerado anteriormente são mais em particular preferidos.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um nanocorpo contra vWF, que se compõem de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam

complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), que é escolhido do grupo composto de nanocorpos com aquela das combinações seguintes de CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente:

- CDR1:NYGMG;
- 5 CDR2:SISWSGTYTAYSDNVKG; CDR3:QSRYSNYYDHDDKYAY
- CDR1:SYTLG; CDR2:GISWSGVSTDYAEFAKG;
- CDR3:LGRYRSNWRNIGQYDY
- CDR1:NYGMG;
- CDR2:TSISWSGSYTAYADNVKG; CDR3:QSRYSNYYDHDDKYAY
- 10 - CDR1:NYNMG; CDR2:SISWSGMSTYYTDSVKG;
- CDR3:SNRYRTHHTQAMYNY
- CDR1:SSAMA; CDR2:T1TSGGRTSYADSVKG; CDR3:VVDGKRAP -
- CDR1:YYNTG; CDR2:AISWSGGLTYADSVKG; CDR3:NRRQKTVQMGGERAYDY
- CDR1:IGAMG; CDR2:TITSGGSTNYADPVKG; CDR3:NLKQGSYGYRFNDY
- 15 CDR1:IGAMG; CDR2:TITSGGSTNYADSVKG; CDR3:NLKQGSYGYRFNDY
- CDR1:IGAMG; CDR2:TITSGGSTNYADSVKG;
- CDR3:NLKQGDYGYRFNDY
- CDR1:IGTMG; CDR2:TITSGGSTNYADSVKG; CDR3:NLKQGDYGYRFNDY
- CDR1:YNPMG; CDR2:AISRTGGSTYYARSVEG; CDR3:AGVRAEDGRVRTLPSEYNF
- 20 CDR1:YNPMG; CDR2:AISRTGGSTYYPDSVEG;
- CDR3:AGVRAEDGRVRTLPSEYTF
- CDR1:YNPMG; CDR2:AISRTGGSTYYPDSVEG;
- CDR3:AGVRAEDGRVRS LPSEYTF

Nos nanocorpos da invenção que compreendem as
 25 combinações do CDR'S acima mencionadas, cada CDR pode ser substituído por um CDR escolhido do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%,

preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com o CDR'S mencionado; em que

5 (1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
10 inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou escolhido do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só I (como indicado no parágrafo precedente) "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido
15 na presente) com o CDR mencionado(s) um do acima mencionado seqüências aminoácidas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente um aminoácido conservador

substituição (conforme definido na presente); e/ou

20 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

Contudo, dos nanocorpos da invenção que compreendem as
25 combinações do CDR'S acima mencionadas, nanocorpos que compreendem um ou vários do CDR'S enumerado anteriormente são em particular preferidos; os nanocorpos compreensão de

dois ou mais do CDR'S enumerado anteriormente são mais em particular preferidos; e os nanocorpos compreensão de três do CDR'S enumerado anteriormente são mais em particular preferidos.

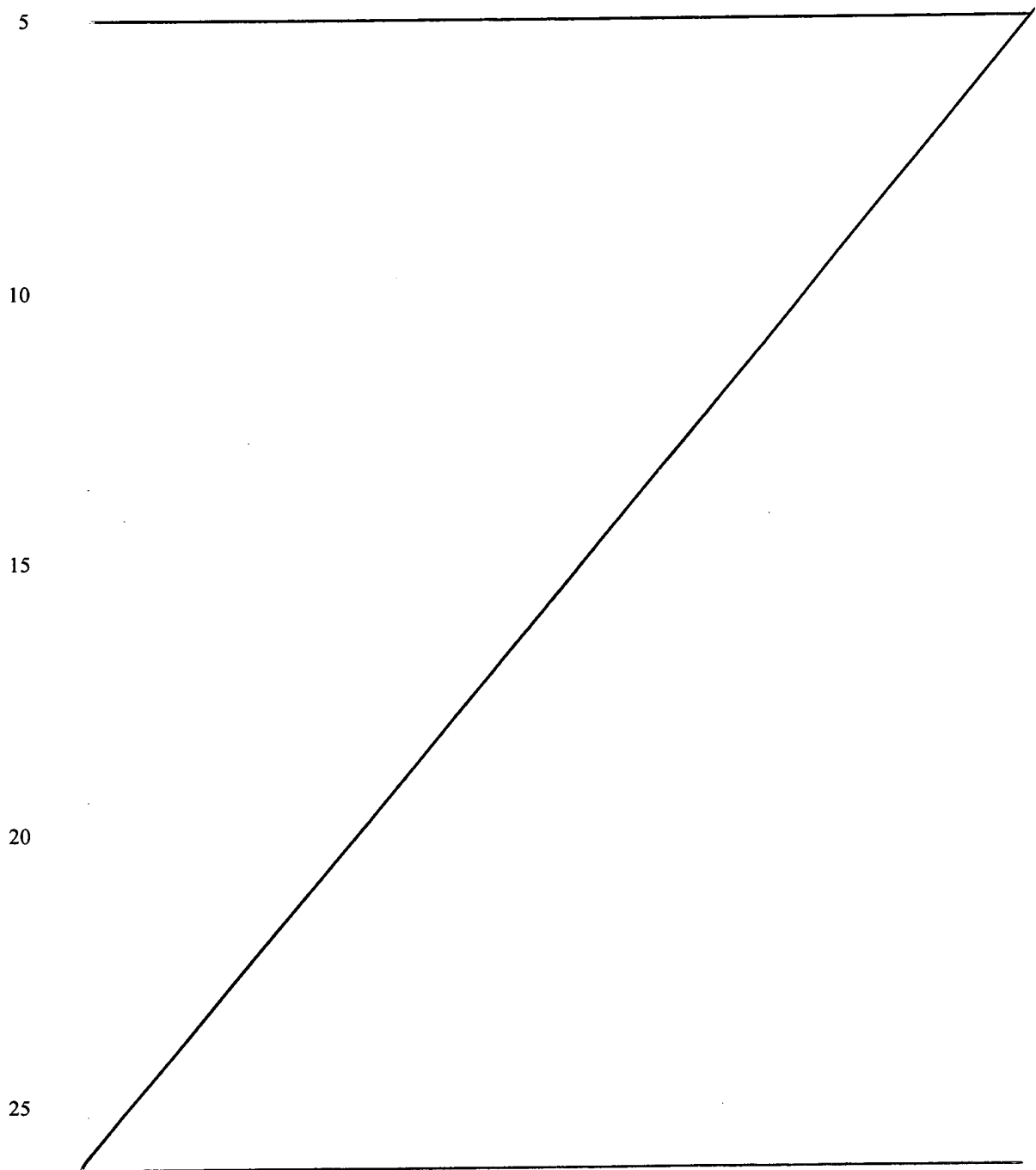


TABELA I: combinações preferenciais de CDR'S, DE CDR'S e seqüências de armação, e do FR'S e humanizado de CDR

CLONE	FR1		CDR1		FR2		CDR1		FR3		CDR3		FR4	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
12A5	1	AVQLVESGGG	1	IGAMG	1	MYRQAPGK	2	TITSGGSTNY	2	RFTISRDPKNTVYLQ	2	NLKQGSYGYRFNDY	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQPGGSLRL	4		7	QRELVA	0	ADPVKG	5		5		7	
	2	SCLASGRIFS	8		4		0		6	MNSLKPEDTAVYYCYA	2		8	
12B1	1	QVQLVESGGG	1	NYGMG	1	WFRQAPGK	2	SISWGSYTY	2	RFTISRDNKNTVYLQ	2	QSRYSNYYDHDDKY	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQAGGSLRL	4		7	EREFVT	0	AYSNDVKG	2	MDSLKPEDTAVYYCAA	5	AY	7	
	3	SCAASGRIFS	9		5		1		7		3		9	
12B6	1	QVQLVESGGG	1	YPMG	1	WFRQAPGK	2	AISRTGGST	2	RFTISRDNKNTVYLQ	2	AGVRAEDGRVRTLPS	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQAGGSLRL	5		7	ERDVA	0	YYARSVEG	2	MNALKPEDTAVYYCAA	5	EYNF	8	
	4	SCAASGRIFS	0		6		2		8		4		0	
12D11	1	AVQLVDSGGG	1	SSYTLG	1	WFRQAPGK	2	GISWGSVST	2	RFTISRDNKNTVYLQ	2	LGRYSNWRNIGQYD	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQAGGSLRL	5		7	EREFVT	0	DYAEFAKG	2	NSLKPEDTAVYYCAA	5	Y	8	
	5	SCTASERTIF	1		7		3		9		5		1	
12-E3	1	EVQLVESGGG	1	NYGMG	1	WFRQAPGK	2	SISWGSYTY	2	RFTISRDNKNTVYLQ	2	QSRYSNYYDHDDKY	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQAGGSLRL	5		7	EREFVT	0	AYADNVKG	3	MDSLKPEDTAVYYCAA	5	AY	8	
	6	SCAASGRIFN	2		8		4		0		6		2	
12C9	1	AVQLVESGGG	1	SSAMA	1	WYRQASGK	2	TITSGGRTSY	2	RFTISRDNKNTVYLQ	2	VVDGKRAP	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQPGGSLKL	5		7	QRELVA	0	ADSVKG	3	MNSLKPEDTAVYDCNF	5		8	
	7	SCATSGSIFS	3		9		5		1		7		3	
14F8	1	AVQLVESGGG	1	YYNTG	1	WFRQAPGK	2	AISWGSGLT	2	RFTISRDNKNTVYLQ	2	NRRQKTVQMGERAYD	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQAGESLRL	5		8	EREFVA	0	YYADSVKG	3	MASLKPEDTAVYYCAA	5	Y	8	
	8	SCTSSGRAFS	4		0		6		2		8		4	
12B4	1	QVQLVESGGG	1	IGAMG	1	LYRQAPGK	2	TITSGGSTNY	2	RFTISRDPKNTVYLQ	2	NLKQGSYGYRFN DY	2	WGQGTQVTVSS
	2	LVQPGGSLRL	5		8	QRELVA	0	ADSVKG	3	MNSLKPEDTAVYYCYA	5		8	
	9	SCLASGRIFS	5		1		7		3		9		5	
12-E8	1	AVQLVESGGG	1	IGAMG	1	LYRQAPGK	2	TITSGGSTNY	2	RFTISRDPKNTVYLQ	2	NLKQGSYGYRFN DY	2	WGQGTQVTVSS
	3	LVQPGGSLRL	5		8	QRELVA	0	ADSVKG	3	MNSLKPEDTAVYYCYA	5		8	
	0	SCLASGRIFS	6		2		8		4		0		6	

CLONE	FR1		CDR1		FR2		CDR1		CDR3		FR3		CDR3		FR4	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
12A2H3	1	EVQLVESGGG	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	LVQPGGSLRL	6	9	9	9	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	SCAASGRIFS	7	YMPMG	3	GRELVA	3	YPPDSVEG	5	MNSLRAEDTAVYYCAA	1	7	7	7	7	7
12A2H4	1	EVQLVESGGG	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	LVQPGGSLRL	6	9	9	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	SCAASGRIFS	8	YMPMG	4	GRELVA	0	YPPDSVEG	6	MNSLRAEDTAVYYCAA	2	7	7	7	7	7
12A2H11	1	EVQLVESGGG	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	LVQPGGSLRL	6	9	9	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	3	SCAASGRIFS	9	YMPMG	5	GRELVA	1	YPPDSVEG	7	MNSLRAEDTAVYYCAA	3	7	7	7	7	7
12A2H13	1	EVQLVESGGG	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	LVQPGGSLRL	7	9	9	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	SCAASGRIFS	0	YMPMG	6	GRELVA	2	YPPDSVEG	8	MNSLRAEDTAVYYCAA	4	7	7	7	7	7
12A5H1	1	EVQLVESGGG	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	LVQPGGSLRL	7	9	9	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	5	SCAASGRIFS	1	IGAMG	7	GRELVA	3	ADPVKG	9	MNSLRAEDTAVYYCYA	5	7	7	7	7	7
12A5H2	1	EVQLVESGGG	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	LVQPGGSLRL	7	9	9	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	6	SCAASGRIFS	2	IGAMG	8	GRELVA	4	ADPVKG	0	MNSLRAEDTAVYYCYA	6	7	7	7	7	7
12A5H3	1	EVQLVESGGG	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	LVQPGGSLRL	7	9	9	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	7	SCAASGRIFS	3	IGAMG	9	GRELVA	5	ADPVKG	1	MNSLRAEDTAVYYCYA	7	7	7	7	7	7

Portanto, nos nanocorpos da invenção, pelo menos uma das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 presentes é apropriadamente escolhida do grupo composto das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I; ou do grupo das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos "identidade de seqüência de 99%" (conforme definido na presente) com pelo menos uma das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I; e/ou do grupo composto do CDR1, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com pelo menos uma das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I. Neste contexto, "por apropriadamente escolhido" quer dizer que, como aplicável, uma seqüência CDR1 é escolhida de seqüências CDR1 convenientes (isto é, conforme definido na presente), uma seqüência CDR2 é escolhida de seqüências CDR2 convenientes (isto é, conforme definido na presente), e uma seqüência CDR3 é escolhida da seqüência CDR3 conveniente (isto é, conforme definido na presente), respectivamente.

Especialmente, nos nanocorpos da invenção, pelo menos a seqüência CDR3 presente é apropriadamente escolhida do grupo composto das seqüências CDR3 enumeradas na Tabela I ou do grupo de seqüências CDR3 que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo

menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos uma das seqüências CDR3 enumeradas na Tabela I; e/ou do grupo composto das seqüências CDR3 que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com pelo menos uma das seqüências CDR3 enumeradas na Tabela I.

Preferivelmente, nos nanocorpos da invenção, pelo menos dois dos CDRI, CDR2 e presente de seqüências CDR3 são apropriadamente escolhidas do grupo composto das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I ou do grupo composto das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos um dos CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I; e/ou do grupo composto das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, que têm 3, 2 ou só "diferença(s) aminoácida(s)" com pelo menos uma das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, me inclinei na Tabela I.

Especialmente, nos nanocorpos da invenção, pelo menos a seqüência CDR3 presente é apropriadamente escolhida do grupo composto das seqüências CDR3 enumeradas na Tabela I ou do grupo de seqüências CDR3 que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos uma das seqüências CDR3

enumeradas na Tabela I, respectivamente; e pelo menos uma das seqüências CDR1 e CDR2 presentes é apropriadamente escolhida do grupo composto do CDRI e seqüências CDR2, respectivamente, enumeradas na Tabela I ou do grupo de CDR I e seqüências CDR2, respectivamente, que têm pelo menos 80%,
5 preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos uma das Seqüências CDR1 e CDR2, respectivamente, enumeradas na Tabela I; e/ou do grupo
10 composto das seqüências CDR1 e CDR2, respectivamente, que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com pelo menos uma das Seqüências CDR1 e CDR2, respectivamente, enumeradas na Tabela I.

Mais preferivelmente, nos nanocorpos da invenção, os
15 três CDRI, CDR2 e o presente de seqüências CDR3 são apropriadamente escolhidas do grupo composto do CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I ou do grupo de CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais
20 preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos um dos CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I; e/ou do grupo composto das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, que têm 3, 2
25 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com pelo menos um dos CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I.

Mesmo mais preferivelmente, nos nanocorpos da invenção, pelo menos uma das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 presentes é apropriadamente escolhida do grupo composto do CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I. Preferivelmente, nesta modalidade de execução, pelo menos uma ou preferivelmente ambas as seqüências CDR presentes são apropriadamente escolhidas de seqüências CDR que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos uma da correspondência seqüências de CDR, respectivamente, enumeradas na Tabela I; e/ou do grupo composto das seqüências CDR que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida com pelo menos uma das seqüências correspondentes, respectivamente, listadas na Tabela I.

Especialmente, nos nanocorpos da invenção, pelo menos a seqüência CDR3 presente é apropriadamente escolhida do grupo composto do CDR3 enumeradas na Tabela I. Preferivelmente, nesta modalidade de execução, pelo menos um e preferivelmente ambos dos CDRI e presente de seqüências CDR2 são apropriadamente escolhidas dos grupos de Seqüências CDR1 e CDR2, respectivamente, que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com o Seqüências CDR1 e CDR2, respectivamente, enumerado em enumeradas na Tabela I; e/ou do grupo composto das seqüências CDR1 e CDR2,

respectivamente, que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com pelo menos uma das Sequências CDR1 e CDR2, respectivamente, enumeradas na Tabela I.

Mesmo mais preferivelmente, nos nanocorpos da invenção, pelo menos dois dos CDRI, CDR2 e presente de seqüências CDR3 são apropriadamente escolhidas do grupo composto do CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I. Preferivelmente, nesta modalidade de execução, o resto da seqüência CDR presente é
10 apropriadamente escolhida do grupo de seqüências CDR que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos uma das seqüências CDR correspondentes enumeradas na Tabela I;
15 e/ou do grupo composto de seqüências CDR que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com pelo menos uma das seqüências correspondentes enumeradas na Tabela I.

Especialmente, nos nanocorpos da invenção, pelo menos a seqüência CDR3 é apropriadamente escolhida do grupo
20 composto das seqüências CDR3 enumeradas na Tabela I, e a seqüência CDR1 ou a seqüência CDR2 são apropriadamente escolhidas do grupo composto do CDRI e seqüências CDR2, respectivamente, enumeradas na Tabela I. Preferivelmente, nesta modalidade de execução, o resto da seqüência CDR
25 presente é apropriadamente escolhida do grupo de seqüências CDR que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais

preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com pelo menos uma das seqüências CDR correspondentes enumeradas na Tabela 1; e/ou do grupo composto de seqüências CDR que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com a correspondência que as seqüências de CDR enumeraram na Tabela I.

Mesmo mais preferivelmente, nos nanocorpos da invenção, os três CDRI, CDR2 e o presente de seqüências CDR3 são apropriadamente escolhidas do grupo composto do CDRI, CDR2 e seqüências CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I.

Também, geralmente, as combinações do CDR'S enumeradas na Tabela I (isto é, os mencionados na mesma linha na Tabela I) são preferidas. Portanto, é geralmente preferido que, quando um CDR em um nanocorpo da invenção é uma seqüência CDR mencionada na Tabela I ou é apropriadamente escolhida do grupo de seqüências CDR que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com uma seqüência CDR enumerada na Tabela I; e/ou do grupo composto de seqüências CDR que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com uma seqüência CDR enumerada na Tabela I, isto pelo menos um e preferivelmente ambos de outro CDR's são apropriadamente escolhidas das seqüências CDR que pertencem à mesma combinação na Tabela I (isto é, mencionado na mesma linha na Tabela I) ou são apropriadamente escolhidas do grupo de

seqüências CDR que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com a seqüência(s) CDR que pertence à mesma combinação e/ou do grupo composto de seqüências CDR que têm 3, 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com a seqüência(s) CDR que pertence à mesma combinação. Outras preferências indicadas nos acima mencionados parágrafos também se aplicam às combinações do CDR'S mencionado na Tabela I.

10 Portanto, por meio de exemplos não-restritivos, um nanocorpo da invenção, por exemplo, pode compreender uma seqüência CDR1 que tem a identidade de seqüência de mais de 80% com uma das seqüências CDR1 mencionadas na Tabela I, uma seqüência CDR2 que tem 3, 2 ou 1 diferença aminoácida com uma das seqüências CDR2 mencionadas na Tabela I (mas pertencendo a uma combinação diferente), e uma seqüência CDR3.

Alguns nanocorpos preferidos da invenção, por exemplo, podem compreender: (1) uma seqüência CDR1 que tem a identidade de seqüência de mais de 80% com uma das seqüências CDR1 mencionadas na Tabela I; uma seqüência CDR2 que tem - 3, 2 ou 1 diferença aminoácida com uma das seqüências CDR2 mencionadas na Tabela I (mas pertencendo a uma combinação diferente); e uma seqüência CDR3 que tem a identidade de seqüência de mais de 80% com uma das seqüências CDR3 mencionadas na Tabela I (mas pertencendo a uma combinação diferente); ou (2) uma seqüência CDR1 que tem

a identidade de seqüência de mais de 80% com

uma das seqüências CDR1 mencionadas na Tabela I; uma seqüência CDR2, e uma das seqüências CDR3 incluíram-se na Tabela I; ou (3) uma seqüência CDR1; uma seqüência CDR2 que
5 tem a identidade de seqüência de mais de 80% com uma da seqüência CDR2 enumerada na Tabela I; e uma seqüência CDR3 que tem 3, 2 ou 1 diferenças aminoácidas com a seqüência CDR3 mencionada na Tabela I que pertence à mesma combinação que a seqüência CDR2.

10 Alguns nanocorpos particularmente preferidos da invenção, por exemplo, podem compreender: (1) uma seqüência CDR1 que tem a identidade de seqüência de mais de 80% com uma das seqüências CDR1 mencionadas na Tabela I; uma seqüência CDR2 que tem 3, 2 ou 1 diferença aminoácida com a
15 seqüência CDR2 mencionada na Tabela I que pertence à mesma combinação; e uma seqüência CDR3 que tem a identidade de seqüência de mais de 80% com a seqüência CDR3 mencionada na Tabela I que pertence à mesma combinação; (2) uma seqüência CDR1; um CDR 2 enumeradas na Tabela I e uma seqüência CDR3
20 listadas na Tabela I (no qual a seqüência CDR2 e a seqüência CDR3 podem pertencer a combinações diferentes).

Alguns nanocorpos até mais preferencial da invenção, por exemplo, podem compreender: (1) uma seqüência CDR1 que tem a identidade de seqüência de mais de 80% com um dos CDR]
25 seqüências mencionadas na Tabela I; a seqüência CDR2 listadas na Tabela I que pertence à mesma combinação; e uma seqüência CDR3 mencionada na Tabela I que pertence a uma

combinação diferente; ou (2) uma seqüência CDR1 mencionada na Tabela I; uma seqüência CDR2 que tem 3, 2 ou 1 diferenças aminoácidas com a seqüência CDR2 mencionada na Tabela I que pertence à mesma combinação; e a identidade de seqüência de
5 mais de 80% com a seqüência CDR3 listadas na Tabela I que pertence à mesma combinação diferente.

nanocorpos particularmente preferidas da invenção, por exemplo, pode compreender uma seqüência CDR1 mencionada na Tabela I, uma seqüência CDR2 que tem mais de 80 identidade
10 de seqüência com a seqüência CDR2 mencionada na Tabela I que pertence à mesma combinação; e a seqüência CDR3 mencionada na Tabela I que pertence ao mesmo.

No mais preferencial nos nanocorpos da invenção, as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 presentes são apropriadamente
15 escolhidas daquela das combinações das seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, enumeradas na Tabela I.

Preferivelmente, quando uma seqüência CDR é apropriadamente escolhida do grupo de seqüências CDR que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais
20 preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências CDR enumeradas na Tabela I; e/ou quando uma seqüência CDR é apropriadamente escolhida do grupo composto de seqüências CDR que têm 3, 2 ou só 1 a
25 diferença(s) aminoácida(s) com uma das seqüências CDR listadas na Tabela 1:

i) qualquer substituição aminoácida é

preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

ii) os referidos que a seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com a seqüência CDR enumerada na Tabela I.

Segundo uma modalidade de execução preferida mas não limitada da invenção, as seqüências CDR nos nanocorpos da invenção são como definidos anteriormente e são também tais que o nanocorpo da invenção liga a vWF com uma dissociação constante (KD) de 10^{-5} a 10^{12} mol/litro (M) ou menos, e preferivelmente 10^{-7} a 10^{-12} mol/litro (M) ou menos e mais preferivelmente 10^{-8} a 10^{-12} mol/litro (M), e/ou com uma associação constante (KA) de pelo menos 10^7 m^{-1} , preferivelmente pelo menos 10^8 m^{-1} , mais preferivelmente pelo menos 10^9 m^{-1} , como pelo menos 10^{12} m^{-1} ; e especialmente com um KD menos de 500 nM, preferivelmente menos de 200 nM, mais preferivelmente menos de 10 nM, como menos de 500 da tarde. O KD e os Valores de KA do nanocorpo da invenção contra vWF podem ser determinados em uma maneira conhecida por si, por exemplo, usando o ensaio descrito na presente. Mais geralmente, os nanocorpos descritos na presente preferivelmente têm uma dissociação constante com respeito a vWF que é como descrito neste parágrafo.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um nanocorpo com uma seqüência aminoácida que é escolhida do grupo composto de 10 NO's SEQ: 60 para 73 e SEQ ID NO's: 86 para

97 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm mais de 80%, preferivelmente mais de 90%, mais preferivelmente mais de 95%, como 99% ou mais "identidade de seqüência" (conforme definido na presente) com uma ou várias das seqüências aminoácidas de SEQ ID NO's: 60 para 73 e SEQ ID NO's: 86 para 97, que seqüências aminoácidas o mais preferivelmente têm seqüências de armação que são mais adiante definidas conforme a descrição geral das seqüências de armação de nanocorpos.

10 Segundo uma modalidade de execução específica, mas não-restritiva, as últimas seqüências aminoácidas foram "humanizadas", conforme adicionalmente descrito mais adiante.

Mais preferivelmente, os nanocorpos da invenção são escolhidos do grupo composto de SEQ ID NO's: 60 para 73 e SEQ ID NO's: 86 para 97, de que os nanocorpos "humanizado" de SEQ ID NO's: 86 para 97 pode ser em particular preferido.

Os nanocorpos que são determinados preferidos segundo a invenção são nanocorpo 12B6 (SEQ ID n. 62) e homólogos e variantes disso, e em determinadas variantes humanizadas disso. Alguns em particular preferidos, mas não-limitando homólogos e variantes (humanizadas) são, por exemplo, nanocorpos 12A2 (SEQ ID n. 71); 12F2 (SEQ ID n. 72); 14H10 (SEQ ID n. 73) e variantes humanizadas disso, como 12B6H1 (SEQ ID n. 86); 12B6H2 (SEQ ID n. 87); 12B6H3 (SEQ ID n. 88); 12B6H4 (SEQ ID n. 89); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n.

93) e 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

Particularmente preferidas na invenção é um nanocorpo 12A2 (SEQ ID n. 71) e homólogos e variantes disso, e em determinadas variantes humanizadas disso. Alguns em particular preferidos, mas não-limitando homólogos e variantes (humanizadas) são, por exemplo, nanocorpos 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e 12A2H13 (SEQ ID n. 94), do qual nanocorpo 12A2H1 (SEQ ID n. 90) é especialmente preferido.

Portanto, um aspecto preferencial mas não-restritivo da invenção relaciona a nanocorpo contra o Fator de von Willebrand (vWF), o referido nanocorpo composto de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), em que:

- a) O CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se de:
 - a seqüência aminoácida YNPMG; ou
 - umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com a seqüência aminoácida YNPMG;
- e
- b) O CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se de:
 - a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; ou
 - uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos 99% identidade de seqüência com a seqüência aminoácida

AISRTGGSTYYPDSVEG; ou

umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1
diferença(s) aminoácida(s) com a seqüência aminoácida
AISRTGGSTYYPDSVEG;

5 e

c) O CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se de:

- a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

- uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%,
preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo
10 menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade
de seqüência de 99% com a seqüência aminoácida
AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

- umas seqüências aminoácidas que tem só 1
diferença aminoácida com o

15 seqüência de aminoácido AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

Especialmente, a invenção refere-se a tal nanocorpo,
em que:

O CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se da
seqüência aminoácida YNPMG;

20 ou em que:

O CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se da
seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG;

ou em que

- O CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se da
25 seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

Por exemplo, a invenção refere-se a tais nanocorpos,
em que:

- O CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF;

5 ou em que:

- O CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG;

10 ou em que:

- O CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida

AISRTGGSTYYPDSVEG; e o CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se de o

15 seqüência de aminoácido AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

Em um aspecto, a invenção refere-se a tal nanocorpo, no qual CDR1 compreende ou essencialmente se compõe da seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida

20 AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

A invenção também se refere a variantes humanizadas de tal nanocorpo. Algumas substituições preferidas, mas não-limitadas, que se humanizam serão descritas na presente, ou serão claras para a pessoa experimentada comparando os

25 correspondentes nanocorpos não-humanizado e humanizado revelados na presente. Algumas substituições de humanização especialmente úteis são um ou vários daqueles apresentam nas

variantes humanizadas de 12A2 (como estará claro para a
pessoa experimentada de uma comparação das seqüências de
12A2H 1 (SEQ ID n. 90) com as correspondentes seqüências
humanizadas de 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92);
5 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

Outro aspecto preferido mas não-restritivo da invenção
relaciona a nanocorpo contra o Fator de von Willebrand
(vWF), o referido nanocorpo composto de 4 regiões de armação
(FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam
10 complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), em que:

d) O CDR1 é:

- a seqüência aminoácida YNPMG; ou
- umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1
diferença(s) aminoácida(s) com a seqüência aminoácida YNPMG;

15 e

e) O CDR2 é

- a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; ou
- uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%,
preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo
20 menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade
de seqüência de 99% com a seqüência aminoácida
AISRTGGSTYYPDSVEG; ou

umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1
diferença(s) aminoácida(s) com a seqüência aminoácida
25 AISRTGGSTYYPDSVEG;

e

f) O CDR3 é:

- a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou
- uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade
5 de seqüência de 99% com a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

- umas seqüências aminoácidas que tem só I diferença aminoácida com o

seqüência de aminoácido AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

10 Especialmente, a invenção refere-se a tal nanocorpo, em que: o CDR1 é a seqüência aminoácida YNPMG;

ou em que:

O CDR2 é a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; ou em que

15 - O CDR3 é a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

Por exemplo, a invenção refere-se a tais nanocorpos, em que:

20 - O CDR1 é a seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 é a seqüência aminoácida

AGVRAEDGRVRTLPSEYTF;

ou em que:

- O CDR1 é a seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR2 é a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG;

25 ou em que:

- O CDR2 é a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; e o CDR3 é a seqüência de aminoácido

AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

Em um aspecto, a invenção refere-se a tal nanocorpo, no qual CDRI é a seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 é a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

5 A invenção também se refere a variantes humanizadas de tal nanocorpo. Algumas substituições preferidas, mas não-limitadas, que se humanizam serão descritas na presente, ou serão aparentes à pessoa experimentada comparando a correspondência não-humanizada e nanocorpo humanizado
10 revelado na presente. Algumas substituições de humanização especialmente úteis são um ou vários daqueles apresentam nas variantes humanizadas de 12A2 (como estará claro para a pessoa experimentada de uma comparação das seqüências de 12A2111 (SEQ ID n. 90) com as correspondentes seqüências
15 humanizadas de 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

O nanocorpos descrito na presente pode ser nanocorpos de classe GLEW, "103 P, R ou S" - classe nanocorpos ou "KERE-classe nanocorpos" (todos conforme descrito na
20 presente). Especialmente, os nanocorpos descrito na presente pode ser KERE-classe nanocorpos, embora a invenção não seja limitada a isso.

Em outro aspecto, a invenção refere-se ao nanocorpo que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos
25 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com pelo menos um dos nanocorpos do grupo composto de SEQ ID NO's 60-73 e SEQ ID NO's 86-97.

Especialmente, a invenção refere-se ao nanocorpo que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com pelo menos um dos nanocorpos 12B6 (SEQ ID n. 62); 12A2 (SEQ ID n. 71); 12F2 (SEQ ID n. 72); 14H10 (SEQ ID n. 73); 12B6H1 (SEQ ID n. 86); 12136H2 (SEQ ID n. 87); 12B6H3 (SEQ ID n. 88); 12B6H4 (SEQ ID n. 89); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H 13 (SEQ ID n. 94).

Mais especialmente, a invenção refere-se ao nanocorpo que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com pelo menos um dos nanocorpos 12A2 (SEQ ID n. 71); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H 13 (SEQ ID n. 94).

Mesmo mais especialmente, a invenção refere-se ao nanocorpo que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com nanocorpo 12A2H1 (SEQ ID n. 90).

A invenção também se refere às variantes humanizadas de tais nanocorpos. Algumas substituições preferidas, mas não-limitadas, que se humanizam serão descritas na presente, ou serão claras para a pessoa experimentada comparando os correspondentes nanocorpos não-humanizado e humanizado revelados na presente. Algumas substituições de humanização

especialmente úteis são um ou vários daqueles apresentam nas variantes humanizadas de 12A2 (como estará claro para a pessoa experimentada de uma comparação das seqüências de 12A2H1 (SEQ ID n. 90) com as correspondentes seqüências humanizadas de 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H1I (SEQ ID n. 93) e 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

A invenção também se refere ao nanocorpo que é escolhido do grupo composto dos nanocorpos de SEQ ID NO's 60-73 e SEQ ID NO's 86-97.

10 Especialmente, a invenção refere-se ao nanocorpo que é escolhido do grupo composto dos nanocorpos 12B6 (SEQ ID n. 62); 12A2 (SEQ ID n. 71); 12F2 (SEQ ID n. 72); 14H10 (SEQ ID n. 73); 12B6H1 (SEQ ID n. 86); 12B6H2 (SEQ ID n. 87); 12B6H3 (SEQ ID n. 88); 12B6H4 (SEQ ID n. 89); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H 11 (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

Mais especialmente, a invenção refere-se ao nanocorpo que é escolhido do grupo composto dos nanocorpos 12A2 (SEQ ID n. 71); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H13 (SEQ ID n. 94). nanocorpo especialmente útil é um nanocorpo 12A2H1 (SEQ ID NO:90).

Os nanocorpos descritos na presente preferivelmente têm seqüências de armação que são como além disso descritas na presente. Algumas seqüências de armação em particular preferenciais (FR1, FR2, FR3 e FR4, respectivamente) são aqueles do nanocorpo 12A2 e as suas variantes humanizadas; e

as seqüências de armação que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma
5 de ditas seqüências de armação; e e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma de ditas seqüências de armação (no qual qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida
10 conservadora; e/ou no qual a referida seqüência aminoácida preferivelmente contém substituições aminoácidas e não mais do que 3 eliminações aminoácidas ou não mais do que 3 inserções aminoácidas). Os nanocorpos contra vWF com tais seqüências de armação formam um novo aspecto da invenção.

15 Especialmente, a invenção refere-se ao nanocorpo contra vWF, no qual FR1 é lo n. 140 SEQ; o FR2 é SEQ ID n. 192; o FR3 é SEQ ID 244; e o FR4 é SEQ ID n. 296; ou as seqüências de armação que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo
20 menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma de ditas seqüências de armação; e e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma de
25 ditas seqüências de armação (no qual qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora; e/ou no qual os referidos a seqüência

aminoácida preferivelmente contém substituições aminoácidas e não mais do que 3 eliminações aminoácidas ou não mais do que 3 inserções aminoácidas).

Mais especialmente, a invenção refere-se ao nanocorpo
5 contra vWF, no qual FR1 é SEQ ID n. 140; o FR2 é lo n. 192 SEQ; o FR3 é SEQ ID 244; e o FR4 é SEQ ID n. 296.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio que compreende ou essencialmente se compõe de pelo menos um nanocorpo contra vWF conforme definido na
10 presente. Tais polipeptídios também são mencionados na presente como "os polipeptídios da invenção" e podem ser conforme mais adiante descritos na presente e/ou como geralmente descrito em WO 02/062551 para os nanocorpos revelados na presente, e, por exemplo, podem ser
15 polipeptídios multivalentes ou polipeptídios multiespecíficos, novamente como mais adiante descrito na presente.

Preferivelmente, um polipeptídio da invenção é bivalente ou trivalente (isto é, compreensão de dois ou três
20 nanocorpos da invenção, respectivamente, opcionalmente ligado via um ou dois linkers conforme definido na presente, respectivamente) ou um polipeptídio multiespecífico, compreendendo um ou dois, e preferivelmente dois, nanocorpos da invenção e pelo menos um nanocorpo dirigido contra uma
25 proteína de soro, e especialmente contra uma proteína de soro humana, como contra uma albumina de soro humano.

Em modalidades de execução preferenciais, mas não-

restritivas, os nanocorpos da invenção presentes nos polipeptídios da invenção são escolhidos do grupo composto de SEQ ID NO's: 60 para 73 e SEQ ID NO's: 86 para 97, e especialmente "do humanizado"

5 nanocorpos de 1o NO's SEQ 86 para 97. Os nanocorpos contra a albumina de soro humano presente nos polipeptídios da invenção são preferivelmente como definidos na presente, e mais preferivelmente escolhidos do grupo composto de SEQ ID NO's: 107 para 121, e especialmente dos nanocorpos
10 "humanizados" contra albumina de soro humana de SEQ ID NO's 114-121.

Alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos dos polipeptídios da invenção são os polipeptídios de SEQ ID NO's: 74 para 82 e os polipeptídios de SEQ ID NO's 98-106.
15 Outros polipeptídios da invenção, por exemplo, podem ser escolhidos do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm mais de 80%, preferivelmente mais de 90%, mais preferivelmente mais de 95%, como 99% ou mais "identidade de seqüência" (conforme definido na presente) com uma ou várias
20 das seqüências aminoácidas de SEQ ID NO's: 74 para 82 e/ou SEQ ID NO's 98 para 106, no qual os nanocorpos compreendidos dentro de ditas seqüências aminoácidas são preferivelmente como definidos na presente.

Segundo um aspecto da invenção, o nanocorpos, a
25 proteína e os polipeptídios descritos na presente não têm essencialmente nenhuma influência na rachadura de ULvWF por ADAMTS-13. Especialmente, quando o nanocorpos, a proteína e

os polipeptídios descritos na presente são usados nas doses descritas na presente, a rachadura de ULvWF por ADAMTS-13 (qualquer in vivo sobre a administração e/ou como medido utilização de um ensaio conveniente, como o ensaio descrito na presente), essencialmente não reduz ou inibe a rachadura de ULvWF por ADAMTS-13, isto é, em não mais de 50%, preferivelmente não mais de 20%, mesmo mais preferivelmente não mais de 10%, como menos de 5% ou essencialmente de modo nenhum). Portanto, um novo aspecto da invenção refere-se ao nanocorpo, proteína ou polipeptídio, e especialmente nanocorpo, proteína ou polipeptídio conforme descrito na presente, isto essencialmente não reduz ou inibe a rachadura de ULvWF por ADAMTS-13.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um ácido nucléico que codifica nanocorpo da invenção e/ou um polipeptídio da invenção. Um ácido tão nucléico também serão referidos abaixo como "um ácido nucléico da invenção" e, por exemplo, pode ser na forma de um construto genético, conforme definido na presente.

Em outro aspecto, a invenção refere-se à célula hospedeira ou hospedeira que expressa ou é capaz de expressar nanocorpo da invenção e/ou um polipeptídio da invenção; e/ou que contém um ácido nucléico que codifica nanocorpo da invenção e/ou a

polipeptídio da invenção. Tal hospedeira ou uma célula hospedeira também podem ser análogos aos anfitriões e apresentar células descritas em WO 02/062551, mas

expressando ou capazes de expressar nanocorpo da invenção e/ou um polipeptídio da invenção e/ou conter um ácido nucléico conforme descrito na presente.

5 A invenção além disso refere-se a um produto ou composição conter ou compreender do nanocorpo da invenção, um polipeptídio da invenção; e/ou um ácido nucléico da invenção. Tal produto ou a composição, por exemplo, podem ser uma composição farmacêutica (conforme descrito mais adiante) ou um produto ou a composição para uso diagnóstico
10 (como também descrito mais adiante). Tal produto ou a composição também podem ser análogos aos produtos e composições descritas em WO 02/062551, mas conter ou compreender nanocorpo da invenção, um polipeptídio da invenção ou um ácido nucléico da invenção.

15 A invenção além disso refere-se a métodos para preparar ou gerar nanocorpos, polipeptídios, ácidos nucléicos, células hospedeiras, produtos e composições tão descritas na presente, que métodos são conforme mais adiante descritos mais adiante. Também, geralmente, o nanocorpos, os
20 polipeptídios, os ácidos nucléicos, as células hospedeiras, os produtos e as composições descritas na presente também podem estar preparados e usados em uma maneira análoga à maneira descrita em WO 02/062551.

A invenção além disso relaciona a aplicações e usos do
25 acima mencionado nanocorpos, polipeptídios, ácidos nucléicos, células hospedeiras, produtos e composições descritas na presente, que as aplicações e os usos incluem,

mas não são limitados a, as aplicações e os usos descreveram a seguir e/ou os novos usos e aplicações para nanocorpos contra vWF e/ou para polipeptídios que contêm o mesmo em WO 02/062551.

5 Outros aspectos, modalidades de execução, vantagens e aplicações da invenção ficarão claros da nova descrição a seguir.

Descrição detalhada da invenção

Os aspectos acima mencionados e outros e modalidades de execução da invenção ficarão claros da nova descrição a seguir, em que:

a) A menos que não indicado ou definido de outra maneira, todos os termos usados têm a sua significação habitual na técnica, que será clara à pessoa experimentada. A referência, por exemplo, é feita aos manuais padrão, como Sambrook e al, "Molecular Cloning: um Laboratório

Manual" (2ª Ed.), Vols. 1-3, a Cold Spring Harbor Laboratory press (1989); F. Ausubel e al, editores., "protocolos Atuais em biologia molecular", Green Publication & InterScience Wiley, Nova York (1987); Roitt et al., "Immunology" (6o. Editor), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); e Janeway et al., "Immunobiology" (6o ed.), Ciência de Grinalda Publishing/Churchill Livingstone, Nova York (2005), bem como a fundamentos técnicos gerais citada acima;

b) A menos que

indicado de outra maneira, o termo "seqüência de

imunoglobulina" - se ele usou na presente para

referir-se a um anticorpo de cadeia pesada ou a um anticorpo de 4 cadeias convencional - é usado como um termo geral para incluir tanto anticorpo de tamanho natural, o indivíduo encadeia disso, como todas as partes, domínios ou fragmentos disso (inclusive, mas não limitado a, domínios de ligação de antígeno ou fragmentos como domínios VHH ou domínios VHNL, respectivamente). Além do mais, o termo "seqüência" como usado na presente (por exemplo, em termos como "seqüência de imunoglobulina", "a seqüência de anticorpo", "seqüência de domínio variável", "seqüência de VHH" ou "seqüência de proteína"), deve ser geralmente entendido para incluir tanto seqüência aminoácida relevante como seqüências ácidas nucléicas ou seqüências de nucleotídeos que codificam o mesmo, a menos que o contexto requeira uma interpretação mais limitada;

c) A menos que indicado de outra maneira, todos os métodos, os passos, as técnicas e as manipulações que não são especificamente descritas detalhadamente podem ser executados e foram executados em uma maneira conhecida por si, como estará claro para a pessoa experimentada. A referência, por exemplo, é novamente feita aos manuais padrão, à fundamentos técnicos gerais mencionada anteriormente e às novas referências citadas na presente;

d) Os resíduos de aminoácido serão indicados segundo o código aminoácido de três letras padrão ou de uma letra, como mencionado na Tabela 1;

Tabela 1: uma Código Aminoácido de 1 letra e três

letras

	Alanina	Ala	A
	Valina	Val	V
	Leucina	Leu	L
	Isoleucina	Ile	I
	Fenilalanina	Phe	F
	Metionina (1'	Met	M
	Triptofan	Trp	W
	Prolina	Pro	P
	Glicina'2	Gly	G
	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Cisteina	Cys	C
	Asparagina	Asn	N
	Glutamina	Gin	Q
	Tirosina	Tyr	Y
	Lisina	Lys	K
	Arginina	Arg	R
	Histidina (4)	His	H
	Aspartato	Asp	D
	Glutamato	Glu	E

Notas:

- (1) Às vezes também considerado ser um aminoácido polar não carregado.
- (2) Às vezes também considerado ser um aminoácido não-polar não carregado.
- (3) Como estará claro para a pessoa experimentada, o fato que um resíduo aminoácido se mostre nesta Tabela como ou carregado ou não carregado a pH 6.0 a 7.0 não reflete de nenhum modo na carga que o referido resíduo aminoácido pode ter a um pH de mais do que 6.0 e/ou a um pH de mais do que 7.0; os resíduos aminoácidos mencionados na Tabela podem ser carregados e/ou não carregados em um pH tão mais alto ou mais baixo, como estará claro para a pessoa experimentada.
- (4) Como é conhecido na técnica, a carga do resíduo His é muito dependente até de pequenas mudanças no pH, mas o resíduo His pode ser geralmente considerado essencialmente não carregado para um pH de aproximadamente 6.5.

e) Para os objetivos de comparar duas ou mais seqüências de nucleotídeos, a porcentagem "da identidade de seqüência" entre uma primeira seqüência de nucleotídeos e uma segunda seqüência de nucleotídeos podem ser calculados dividindo-se [o número de nucleotídeos na primeira seqüência de nucleotídeos que são idênticos ao nucleotídeos nas posições correspondentes na segunda seqüência de nucleotídeos] [pelo número total de nucleotídeos na primeira seqüência de nucleotídeos] e multiplicando por [100%], nos quais cada eliminação, inserção, substituição ou adição de um nucleotídeos na segunda seqüência de nucleotídeos - em comparação com a primeira seqüência de nucleotídeos - são consideradas como uma diferença em um nucleotídeo único (posição). Alternativamente, o grau da identidade de

seqüência entre duas ou mais seqüências de nucleotídeos pode ser calculado usando um algoritmo de computador conhecido para alinhamento de seqüência como NCBI Blast v2.0, usando configurações padrão.

5 Algumas outras técnicas, algoritmos de computador e configurações para determinar o grau da identidade de seqüência, por exemplo, são descritos em WO 04/037999, EP 0 967284, EP 1085089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 e a GB 2357 768-A.

10 Normalmente, para o objetivo de determinar a porcentagem "da identidade de seqüência" entre duas seqüências de nucleotídeos conforme o método de cálculo delineado mais acima, a seqüência de nucleotídeos com o número maior de nucleotídeos será tomada como "a primeira" seqüência de nucleotídeos, e outra seqüência de nucleotídeos será tomada como "a segunda" seqüência de nucleotídeos;

f) Para os objetivos de comparar duas ou mais seqüências aminoácidas, a porcentagem "da identidade de seqüência" entre uma primeira seqüência aminoácida e uma
20 segunda seqüência aminoácida podem ser calculados dividindo-se [o número de resíduos aminoácidos na primeira seqüência aminoácida que são idênticos aos resíduos aminoácidos nas posições correspondentes na segunda seqüência aminoácida] [pelo número total de nucleotídeos na primeira seqüência aminoácida] e multiplicando por [100%], nos quais cada
25 eliminação, inserção, substituição ou adição de um resíduo aminoácido na segunda seqüência aminoácida - em comparação

com a primeira seqüência aminoácida - são consideradas como uma diferença em um resíduo aminoácido único (posição), isto é, como uma "diferença aminoácida" conforme definido na presente. Alternativamente, o grau da identidade de seqüência entre duas seqüências aminoácidas pode ser calculado usando um algoritmo de computador conhecido, como os acima mencionados para determinação do grau da identidade de seqüência para seqüências de nucleotídeos, novamente usando configurações padrão.

Normalmente, para o objetivo de determinar a porcentagem "da identidade de seqüência" entre duas seqüências aminoácidas conforme o método de cálculo delineado mais acima, a seqüência aminoácida com o número maior de resíduos aminoácidos será tomada como "a primeira" seqüência aminoácida, e outra seqüência aminoácida será tomada como "a segunda" seqüência aminoácida.

Também, na determinação do grau da identidade de seqüência entre duas seqüências aminoácidas, a pessoa experimentada pode considerar assim chamadas substituições aminoácidas "conservadoras", que podem ser geralmente descritas como substituições aminoácidas nas quais um resíduo aminoácido é substituído com outro resíduo aminoácido da estrutura química semelhante e que não tem pouco ou essencialmente nenhuma influência na função, atividade ou outras propriedades biológicas do polipeptídio. Tais substituições aminoácidas conservadoras são bem conhecidas na técnica, por exemplo, de WO 04/037999, a GB

uns 2357768, WO 98/49185, WO 00/46383 e WO 01/09300; e os tipos (preferidos) e/ou as combinações de tais substituições podem ser selecionados com base nos ensinamentos pertinentes de WO 04/037999 bem como WO 98/49185 e das novas referências citadas na presente.

Tais substituições conservadoras preferivelmente são substituições nas quais aminoácido dentro dos grupos seguintes (a) - (e) é substituído por outro resíduo aminoácido dentro do mesmo grupo: (a) pequeno alifático, resíduos não-polares ou ligeiramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro e Gly; (b) polar, resíduos negativamente carregados e His (não carregado) amidas: Asp, Asn, Glu e Gln; (c) polar, resíduos positivamente carregados: His, Arg e Lys; (d) grande alifático, resíduos não-polares: Met, Leu, Ile, Val e Cys; e resíduos aromáticos (e): Phe, Tyr e Trp.

As substituições conservadoras em particular preferenciais são como se segue: Ala em Gly ou em Ser; Arg em Lys; Asn em Gln ou no Seu; Asp em Glu; Cys em Ser; Gln em Asn; Glu em Asp; Gly em Ala ou em Pro; His em Asn ou em Gln; Ile em Leu ou em Val; Leu em Ile ou em Val; Lys em Arg, em Gln ou em Glu; Met em Leu, em Tyr ou em Ile; Phe em Met, em Leu ou em Tyr; Ser em Thr; Thr em Ser; Trp em Tyr; Tyr em Trp; e/ou Phe em Val, em Ile ou em Leu.

Qualquer substituição aminoácida aplicada aos polipeptídeos descritos na presente também pode ser baseada na análise das frequências de variações aminoácidas entre a proteína homóloga da espécie diferente desenvolvida por

Schulz et al., Princípios de Estrutura de Proteína, Springer-Verlag, 1978, nas análises de estrutura que forma potenciais desenvolvidos por Chou e Fasman, Bioquímica 13: 211, 1974 e Adv. Enzymol., 47: 45149, 1978, e na análise de
5 modelos hidrofobicidade em proteína desenvolvida por Eisenberg et al., Proc. Louco. Acad Sci. Os EUA 81: 140-144, 1984; Kyte e Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 1981, e Goldman et al., Ann. Chapman Biophys. Chem. 15: 321353, 1986, todos incorporado na presente no seu conjunto por
10 referência. Informação na estrutura primária, secundária e terciária de nanocorpos dado na descrição mais adiante e na técnica de fundo geral citada anteriormente. Também, com esta finalidade, a estrutura cristalina de um domínio VHH de uma lhama, por exemplo, é dada por Desmyter et al., Natureza
15 Biologia Estrutural, volume 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., Biologia Estrutural Natural (1996); 3, 752757; e Decanniere et al., Estrutura, volume 7, 4, 361 (1999);

g) diz-se que seqüências de aminoácido e seqüências ácidas nucleicas sejam "exatamente o mesmo" se eles tiverem
20 a identidade de seqüência de 100% (conforme definido na presente) por cima do seu comprimento inteiro;

h) comparando duas seqüências aminoácidas, o termo "diferença aminoácida" refere-se a uma inserção, eliminação ou substituição de um resíduo aminoácido único em uma
25 posição da primeira seqüência, em comparação com a segunda seqüência; sendo entendido que duas seqüências aminoácidas podem conter um, duas ou mais tais diferenças aminoácidas;

i) considera-se que uma seqüência ácida nucléica ou a seqüência aminoácida é "em essencialmente isolado (forma)" - por exemplo, em comparação com a sua fonte biológica nativa e/ou o meio de reação ou meio de cultivo do qual foi obtido - quando foi separado de pelo menos um outro componente com o qual ele se associa normalmente em dita fonte ou meio, como outro ácido nucléico, outra proteína/polipeptídio, outro componente biológico ou macromolécula ou pelo menos um contaminante, impureza ou componente menor. Especialmente, uma seqüência ácida nucléica ou a seqüência aminoácida são consideradas "essencialmente isoladas" quando foi purificado pelo menos de 2 vezes, especialmente pelo menos 10fold, mais especialmente pelo menos de 100 vezes, e até a 1000 vezes ou mais. Uma seqüência ácida nucléica ou a seqüência aminoácida que é "na forma essencialmente isolada" são preferivelmente essencialmente homogêneas, como determinado utilização de uma técnica conveniente, como uma técnica cromatográfica conveniente, como poliacrilamida-geleleetroforese;

j) O termo "domínio" como usado na presente geralmente refere-se a uma região globular de uma cadeia de anticorpos, e especialmente a uma região globular de um anticorpo de cadeia pesada, ou a um polipeptídio que essencialmente se compõe de tal região globular. Normalmente, tal domínio compreenderá laços de peptídeos (por exemplo, 3 ou 4 laços de peptídeos) estabilizado, por exemplo, como uma folha ou por ligações bissulfeto.

k) O termo "antigênico" determinante' refere-se ao

epitope no antígeno reconhecido pela molécula de ligação de antígeno (como um Nanobody ou um polipeptídio da invenção) e mais especialmente pelo sítio de ligação de antígeno da referida molécula. Os termos "antigênico determinante" e "epitope" também podem ser usados de modo trocável na presente.

1) Uma seqüência aminoácida (como um Nanobody, um anticorpo, um polipeptídio da invenção, ou geralmente um proteína de ligação de antígeno ou polipeptídio ou um fragmento disso) que pode ligar a, que tem a afinidade para e/ou que tem a especificidade para diz-se que um determinante antigênico específico, epitope, o antígeno ou a proteína (ou para pelo menos uma parte, fragmento ou epitope disso) esteja "contra" ou "dirigido contra" dito determinante antigênico, epitope, antígeno ou proteína.

m) O termo "especificidade" refere-se ao número de tipos diferentes de antígenos ou determinantes antigênicos aos quais uma determinada molécula de ligação de antígeno ou proteína de ligação de antígeno (como um Nanobody ou um polipeptídio da invenção) a molécula pode ligar. A especificidade de uma proteína de ligação de antígeno pode ser determinada baseada em afinidade e/ou avidéz. A afinidade, representada pelo equilíbrio constante para a dissociação de um antígeno com uma proteína de ligação de antígeno (KD), é uma medida para a força de ligação entre um determinante antigênico e um sítio de ligação de antígeno na proteína de ligação de antígeno: o menor o valor do KD, o

mais forte a força de ligação entre um determinante antigênico e a molécula de ligação de antígeno (alternativamente, a afinidade também pode ser expressa como a afinidade constante (KA), que é 1/KD). Como estará claro para a pessoa experimentada (por exemplo, com base na nova 5 revelação na presente), a afinidade pode ser determinada em uma maneira conhecida por si, dependendo do antígeno específico do interesse. A avidéz é a medida da força da ligação entre uma molécula de ligação de antígeno (como um 10 Nanobody ou o polipeptídio da invenção) e o antígeno pertinente. A avidéz está relacionada tanto à afinidade entre um determinante antigênico e sítio de ligação de antígeno na molécula de ligação de antígeno como ao número de sítios de ligação presentes pertinente na molécula de 15 ligação de antígeno. Tipicamente, a proteína de ligação de antígeno (como os nanocorpos e/ou os polipeptídios da invenção) ligará com uma dissociação constante (KD) de 10^{-5} a 10^{-12} mol/litro (M) ou menos, e preferivelmente 10^{-7} a 10^{-12} mol/litro (M) ou menos e mais preferivelmente 10^{-8} a 10^{-12} mol/litro, e/ou com uma associação constante (KA) de pelo 20 menos 10^7 M⁻¹, preferivelmente pelo menos 10^8 M⁻¹, mais preferivelmente pelo menos 10^9 M⁻¹, como pelo menos 10^{12} m⁻¹. Considera-se geralmente que qualquer valor de KD maior do que 10^{-4} M indica a ligação não-específica. Preferivelmente, 25 um Nanobody ou o polipeptídio da invenção ligarão ao antígeno desejado com um KD menos de 500 nM, preferivelmente menos de 200 nM, mais preferivelmente menos de 10 nM, como

menos de 500 da tarde. A ligação específica de uma proteína antígeno-ligante a um antígeno ou determinante antigênico pode ser determinada em qualquer maneira conveniente conhecida por si, inclusive, por exemplo, análise de Scatchard e/ou ensaios de ligação competitivos, como rádio-inumoensaios (RIA), imunoensaios de enzima (EIA) e ensaios de competição de sandwich, e as variantes diferentes deles conhecidas per se na técnica. o n) conforme adicionalmente descrito a seguir, a seqüência aminoácida e a estrutura de um Nanobody pode ser considerado - sem ser limitado contudo a isso - para ser compreendido de quatro regiões de armação ou "FR'S", que são referidos na técnica e a seguir como "região de Armação 1" ou "FR1"; como "região de Armação 2" ou "FR2"; como "região de Armação 3" ou "FRITO"; e como "região de Armação 4" ou "FR4", respectivamente; que regiões de armação são interrompidas por três regiões de determinação complementares ou "CDR's", que são referidos na técnica como "Região que Determina Complementaridade] "ou" CDRI"; como "Região que Determina Complementaridade 2" ou "CDR2"; e como "Região que Determina Complementaridade 3" ou "CDR3", respectivamente;

o) como também adicionalmente descrito a seguir, o número total de resíduos aminoácidos em um Nanobody pode estar na região de 110-120, é preferivelmente 112-115, e é mais preferivelmente 113. Deve contudo ser observado que as partes, os fragmentos ou os análogos (conforme adicionalmente descrito a seguir) de um Nanobody não são em

particular limitados quanto ao seu comprimento e/ou tamanho, enquanto tais partes, os fragmentos ou os análogos satisfazem condições delineadas a seguir e são também preferivelmente convenientes para os objetivos descritos na presente;

5 p) os resíduos aminoácidos de um Nanobody são numerados segundo a numeração geral para domínios de VH dados por Kabat et al. ("A seqüência da proteína do interesse imunológico", os Serviços de Saúde Pública dos Estados Unidos, NIH Bethesda, MD, Publicação n. 91), aplicado a domínios VHH de Camelídeos no artigo de Riechmann e Muyldermans, mencionado anteriormente (ver, por exemplo, a Figura 2 da referida referência). Segundo esta numeração, FR1 de um Nanobody compreende os resíduos aminoácidos nas posições 130, CDR1 de um Nanobody compreende os resíduos aminoácidos nas posições 31-36, FR2 de um Nanobody compreende os aminoácidos nas posições 36-49, CDR2 de um Nanobody compreende os resíduos aminoácidos nas posições 50-65, FR3 de um Nanobody compreende os resíduos aminoácidos nas posições 66-94, CDR3 de um Nanobody compreende os resíduos aminoácidos nas posições 95-102, e FR4 de um Nanobody compreende os resíduos aminoácidos nas posições 103-113. [Neste aspecto, deve ser observado que - como é bem conhecido na técnica para domínios de VH e para domínios de VHH - o número total de resíduos aminoácidos em cada um do CDR'S pode variar e corresponder não ao número total de resíduos aminoácidos indicados pela numeração de Kabat (isto

é, uma ou várias posições segundo a numeração de Kabat não podem ser ocupadas na seqüência real, ou a seqüência real pode conter mais resíduos aminoácidos do que o número levado em conta pela numeração de Kabat). Isto significa que, geralmente, a numeração segundo Kabat podem ou não corresponder à numeração real dos resíduos aminoácidos na seqüência real. Geralmente, contudo, se pode dizer que, segundo a numeração de Kabat e independente do número de resíduos aminoácidos no CDR'S, a posição 1 segundo a numeração de Kabat corresponde ao início de FR1 e visto versa, a posição 36 segundo a numeração de Kabat corresponde ao início de FR2 e visto versa, a posição 66 segundo a numeração de Kabat corresponde ao início de FR3 e visto versa, e a posição 103 segundo a numeração de Kabat corresponde ao início de FR4 e visto versa.].

Os métodos alternativos para numeração dos resíduos aminoácidos de domínios VH, cujos métodos também podem ser aplicados em uma maneira análoga a domínios VHH de Camelídeos e a nanocorpos, são o método descrito por Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989)), a assim chamada "definição de AbM" e a assim chamada "definição de contato". Contudo, na descrição presente, as reivindicações e as figuras, a numeração segundo Kabat aplicada a domínios VHH por Riechmann e Muyldermans serão seguidas, a menos que indicado de outra maneira; e

q) as Figuras, a Listagem de Seqüência e a Parte/Exemplos Experimental só são dadas para ilustrar além

disso a invenção e não devem ser interpretadas ou entendidas como limitação do alcance da invenção e/ou das reivindicações anexas de qualquer modo, a menos que explicitamente indicado de outra maneira na presente.

5 Para uma descrição geral de anticorpos de cadeias pesadas e domínios variáveis dos mesmos, a referência é entre outras coisas feita às referências seguintes, que são mencionadas como fundamentos técnicos gerais: WO 94/04678, WO 95/04079 e WO 96/34103 da Vrije Universiteit Brussel; WO
10 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 e WO 02/48193 de Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 e WO 03/055527 do Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics N.V. e
15 solicitante; WO 01/90190 pelo National Research Council of Canada; WO 03/025020 (= EP 1 433 793) pelo Institute of Antibodies; bem como WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 pelo solicitante e os outros pedidos de patentes pelo solicitante; Hamers-
20 Casterman et al., Nature 1993 June 3; 363 (6428): 446-8; Davies and Riechmann, FEBS Lett. 1994 Feb 21; 339(3): 285-90; Muyldermans et al., Protein Eng. 1994 Sep; 7(9): 1129-3; Davies and Riechmann, Biotechnology (NY) 1995 May; 13(5): 475-9; Gharoudi et al., 9th Forum of Applied Biotechnology, Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 1995; 60/4a part I: 2097-
25 2100; Davies and Riechmann, Protein Eng. 1996 Jun; 9(6): 531-7; Desmyter et al., Nat Struct Biol. 1996 Sep; 3(9):

803-11; Sheriff et al., *Nat Struct Biol.* 1996 Sep; 3(9):
733-6; Spinelli et al., *Nat Struct Biol.* 1996 Sep; 3(9):
752-7; Arbabi Ghahroudi et al., *FEBS Lett.* 1997 Sep 15;
414(3): 521-6; Vu et al., *Mol Immunol.* 1997 Nov-Dec; 34(16-
5 17): 1121-31; Atarhouch et al., *Journal of Camel Practice
and Research* 1997; 4: 177-182; Nguyen et al., *J. Mol. Biol.*
1998 Jan 23; 275(3): 413-8; Lauwereys et al., *EMBO J.* 1998
Jul 1; 17(13): 3512-20; Frenken et al., *Res Immunol.* 1998
Jul-Aug;149(6):589-99; Transue et al., *Proteins* 1998 Sep 1;
10 32(4): 51522; Muyldermans and Lauwereys, *J. Mol. Recognit.*
1999 Mar-Apr; 12 (2): 131-40; van der Linden et al.,
Biochim. Biophys. Acta 1999 Apr 12; 1431(1): 37-46.;
Decanniere et al., *Structure Fold. Des.* 1999 Apr 15; 7(4):
361-70; Ngyuen et al., *Mol. Immunol.* 1999 Jun; 36(8): 515-
15 24; Woolven et al., *Immunogenetics* 1999 Oct; 50 (1-2): 98-
101; Riechmann and Muyldermans, *J. Immunol. Methods* 1999 Dec
10; 231 (1-2): 25-38; Spinelli et al., *Biochemistry* 2000 Feb
15; 39(6): 1217-22; Frenken et al., *J. Biotechnol.* 2000 Feb
28; 78(1): 11-21; Nguyen et al., *EMBO J.* 2000 Mar 1; 19(5):
20 921-30; van der Linden et al., *J. Immunol. Methods* 2000 Jun
23; 240 (1-2): 185-95; Decanniere et al., *J. Mol. Biol.* 2000
Jun 30; 300 (1): 83-91; van der Linden et al., *J.*
Biotechnol. 2000 Jul 14; 80(3): 261-70; Harmsen et al., *Mol.*
Immunol. 2000 Aug; 37(10): 579-90; Perez et al.,
25 *Biochemistry* 2001 Jan 9; 40(1): 74-83; Conrath et al., *J.*
Biol. Chem. 2001 Mar 9; 276 (10): 7346-50; Muyldermans et
al., *Trends Biochem Sci.* 2001 Apr;26(4):230-5; Muyldermans

S., *J. Biotechnol.* 2001 Jun; 74 (4): 277-302; Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 2001 Jul 13 ;276 (28): 26285-90; Spinelli et al., *J. Mol. Biol.* 2001 Aug 3; 311 (1): 123-9; Conrath et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Oct; 45
5 (10): 2807-12; Decanniere et al., *J. Mol. Biol.* 2001 Oct 26; 313(3): 473-8; Nguyen et al., *Adv Immunol.* 2001; 79: 261-96; Muruganandam et al., *FASEB J.* 2002 Feb; 16 (2): 240-2; Ewert et al., *Biochemistry* 2002 Mar 19; 41 (11): 3628-36; Dumoulin et al., *Protein Sci.* 2002 Mar; 11 (3): 500-15; Cortez-
10 Retamozo et al., *Int. J. Cancer.* 2002 Mar 20; 98 (3): 456-62; Su et al., *Mol. Biol. Evol.* 2002 Mar; 19 (3): 205-15; van der Vaart JM., *Methods Mol Biol.* 2002; 178: 359-66; Vranken et al., *Biochemistry* 2002 Jul 9; 41 (27): 8570-9; Nguyen et al., *Immunogenetics* 2002 Apr; 54 (1): 39-47;
15 Renisio et al., *Proteins* 2002 Jun 1; 47 (4): 546-55; Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 2002 Jun 28; 277 (26): 23645-50; Ledebouer et al., *J. Dairy Sci.* 2002 Jun; 85 (6): 1376-82; De Genst et al., *J. Biol. Chem.* 2002 Aug 16; 277 (33): 29897-907; Ferrat et al., *Biochem. J.* 2002 Sep 1; 366
20 (Pt 2): 415-22; Thomassen et al., *Enzyme and Microbial Technol.* 2002; 30: 273-8; Harmsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002 Dec; 60 (4): 449-54; Jobling et al., *Nat Biotechnol.* 2003 Jan; 21 (1): 77-80; Conrath et al., *Dev. Comp. Immunol.* 2003 Feb; 27 (2): 87-103; Pleschberger et al., *Bioconjug. Chem.* 2003 Mar-Apr; 14 (2): 440-8; Lah et al., *J. Biol. Chem.* 2003 Apr 18; 278 (16): 14101-11; Nguyen et al., *Immunology.* 2003 May; 109 (1): 93-101; Joosten et

al., *Microb. Cell Fact.* 2003 Jan 30; 2 (1): 1; Li et al.,
Proteins 2003 Jul 1; 52 (1): 4750; Loris et al., *Biol Chem.*
2003 Jul 25; 278 (30): 28252-7; van Koningsbruggen et al.,
J. Immunol. Methods. 2003 Aug; 279 (1-2): 149-61; Dumoulin
5 et al., *Nature.* 2003 Aug 14; 424 (6950): 783-8; Bond et al.,
J. Mol. Biol. 2003 Sep 19; 332 (3): 643-55; Yau et al., *J.*
Immunol. Methods. 2003 Oct 1; 281 (1-2): 161-75; Dekker et
al., *J. Virol.* 2003 Nov; 77 (22): 12132-9; Meddeb-Mouelhi et
al., *Toxicon.* 2003 Dec; 42 (7): 785-91; Verheesen et al.,
10 *Biochim. Biophys. Acta* 2003 Dec 5; 1624 (1-3): 21-8; Zhang
et al., *J Mol Biol.* 2004 Jan 2; 335 (1): 49-56; Stijlemans
et al., *J Biol Chem.* 2004 Jan 9; 279 (2): 1256-61; Cortez-
Retamozo et al., *Cancer Res.* 2004 Apr 15; 64 (8): 2853-7;
Spinelli et al., *FEBS Lett.* 2004 Apr 23; 564 (1-2): 35-40;
15 Pleschberger et al., *Bioconjug. Chem.* 2004 May-Jun; 15 (3):
664-71; Nicaise et al., *Protein Sci.* 2004 Jul; 13 (7): 1882-
91; Omidfar et al., *Tumour Biol.* 2004 Jul-Aug; 25 (4): 179-
87; Omidfar et al., *Tumour Biol.* 2004 Sep-Dec; 25(5-6): 296-
305; Szynol et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2004
20 Sep; 48(9):3390-5; Saerens et al., *J. Biol. Chem.* 2004 Dec
10; 279 (50): 51965-72; De Genst et al., *J. Biol. Chem.* 2004
Dec 17; 279 (51): 53593-601; Dolk et al., *Appl. Environ.*
Microbiol. 2005 Jan; 71(1): 442-50; Joosten et al., *Appl*
Microbiol Biotechnol. 2005 Jan; 66(4): 384-92; Dumoulin et
25 al., *J. Mol. Biol.* 2005 Feb 25; 346 (3): 773-88; Yau et al.,
J Immunol Methods. 2005 Feb; 297 (1-2): 213-24; De Genst et
al., *J. Biol. Chem.* 2005 Apr 8; 280 (14): 14114-21; Huang et

al., Eur. J. Hum. Genet. 2005 Apr 13; Dolk et al., Proteins. 2005 May 15; 59 (3): 555-64; Bond et al., J. Mol. Biol. 2005 May 6;348(3):699-709; Zarebski et al., J. Mol. Biol. 2005 Apr 21; [E-publicação antes da impressão].

5 Conforme acima mencionado, a invenção geralmente refere-se aos nanocorpos dirigidos contra vWF, bem como à polipeptídios compreendendo ou essencialmente compostos de um ou vários de tais nanocorpos, que podem ser usados para fins profiláticos, terapêuticos e/ou diagnósticos descritos
10 mais adiante e em WO 04/062551.

 Conforme também acima mencionado e além disso descrito mais adiante, a invenção além disso se refere aos ácidos nucleicos que codificam tais nanocorpos e polipeptídios, a métodos para preparar tais nanocorpos e polipeptídios,
15 apresentar células que expressam ou são capazes de expressar tais nanocorpos ou polipeptídios, a usos de tais nanocorpos, polipeptídios, ácidos nucleicos ou células hospedeiras, e a composições que compreendem tais nanocorpos, polipeptídios, ácidos nucleicos ou células hospedeiras.

20 Geralmente, deve ser observado que o termo Nanobody como usado na presente no seu sentido mais amplo não é limitado a uma fonte biológica específica ou a um método específico da preparação. Por exemplo, como será discutido mais detalhadamente mais adiante, os nanocorpos da invenção
25 podem ser obtidos (1) isolando o domínio VHH de um anticorpo de cadeia pesada que ocorre naturalmente; (2) por expressão de uma seqüência de nucleotídeos que codifica um domínio VHH

de ocorrência natural; (3) "por humanização" (conforme descrito mais adiante) de um domínio VHH de ocorrência natural ou por expressão de um ácido nucléico que codifica tal domínio VHH humanizado; (4) por "camelização" (conforme descrito mais adiante) de um domínio VH de ocorrência natural de qualquer espécie dos animais, especialmente uma espécie de mamífero, como de um ser humano, ou por expressão de um ácido nucléico que codifica tal domínio VH camelizado; (5) por "camelização" "de um anticorpo de domínio" ou "Dab" como descrito por Ward e al (supra), ou pela expressão de um ácido nucléico que codifica tal domínio VH camelizado; (6) técnicas sintéticas ou semi-sintéticas usam que para preparam proteína, polipeptídios ou outras seqüências aminoácidas; (7) preparando um ácido nucléico que codifica um Nanobody utilizando técnicas síntese ácida para nucléica, seguida por expressão do ácido nucléico conseqüentemente obtido; e/ou (8) por qualquer combinação do precedente. Os métodos convenientes e as técnicas para executar o precedente serão claras para a pessoa experimentada baseada na revelação na presente e, por exemplo, incluirão os métodos e técnicas descritas mais detalhadamente a seguir.

Contudo, segundo uma modalidade de execução específica, os nanocorpos da invenção não têm uma seqüência aminoácida que é exatamente o mesmo como (isto é, como um grau de identidade de seqüência de 100% com) a seqüência aminoácida de um domínio VH de ocorrência natural, como a

seqüência aminoácida de um domínio VH de ocorrência natural de um mamífero, e especialmente de um ser humano.

Uma classe em particular preferencial de nanocorpos da invenção compreende nanocorpos com uma seqüência aminoácida que corresponde à seqüência aminoácida de um domínio VHH de
5 ocorrência natural, mas que foi "humanizado", isto é, substituindo um ou vários resíduos aminoácidos na seqüência aminoácida da referida seqüência VHH de ocorrência natural por um ou vários dos resíduos aminoácidos que ocorrem na
10 posição(ões) correspondente em um domínio VH de um anticorpo de 4 cadeias convencional de um ser humano (p. ex. indicado anteriormente). Isto pode ser executado em uma maneira conhecida por si, o que ficará claro para a pessoa experimentada, por exemplo, com base na nova descrição mais
15 adiante e a arte prévia na humanização mencionada na presente. Novamente, deve ser observado que tais nanocorpos humanizados da invenção podem ser obtidos em qualquer maneira conveniente conhecida por si (isto é, como indicado conforme os pontos (1) - (8) acima) e, portanto não são
20 estritamente limitados a polipeptídios que foram obtidos usando um polipeptídio que compreende um domínio VHH de ocorrência natural como um material inicial.

Outra classe em particular preferencial de nanocorpos da invenção compreende nanocorpos com uma seqüência
25 aminoácida que corresponde à seqüência aminoácida de um domínio VH de ocorrência natural que foi "camelizado", isto é, substituindo um ou vários resíduos aminoácidos na

seqüência aminoácida de um domínio VH de ocorrência natural de um anticorpo de 4 cadeias convencional por um ou vários dos resíduos aminoácidos que ocorrem na posição(ões) correspondente em um domínio VHH de um anticorpo de cadeia pesada. Isto pode ser executado em uma maneira conhecida por si, o que ficará claro para a pessoa experimentada, por exemplo, com base na nova descrição mais adiante. A referência também é feita a WO 94/04678. Tal camelização pode ocorrer preferencialmente nas posições aminoácidas que estão presentes na interface VH-VL e nos assim chamados resíduos de Hallmark Camelidae (ver, por exemplo, também WO 94/04678), como também mencionado mais adiante. Preferivelmente, o domínio VH ou a seqüência que é usada como um material inicial ou ponto de partida que para gera ou e projeta o Nanobody camelizado é preferivelmente uma seqüência VH de um mamífero, mais preferivelmente a seqüência VH de um ser humano. Contudo, deve ser observado que tais nanocorpos camelizados da invenção podem ser obtidos em qualquer maneira conveniente conhecida por si (isto é, como indicado conforme os pontos (1) - (8) acima) e portanto não são estritamente limitados a polipeptídios que foram obtidos usando um polipeptídio que compreende um domínio VH de ocorrência natural como um material inicial.

Por exemplo, novamente conforme adicionalmente descrito mais adiante, tanto "humanização" como "camelização" pode ser executado fornecendo uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma tal domínio VHH ou domínio VH

que ocorrem naturalmente, respectivamente, e logo modificação, em uma maneira conhecida por si, um ou vários codons na seqüência de nucleotídeos tal que a nova seqüência de nucleotídeos codifica um Nanobody humanizado ou camelizado da invenção, respectivamente, e logo expressando a seqüência de nucleotídeos portanto obtida em uma maneira conhecida por si para fornecer o Nanobody desejado da invenção. Alternativamente, baseado na seqüência aminoácida de um domínio VHH de ocorrência natural ou o domínio VH, respectivamente, a seqüência aminoácida do desejado Nanobody humanizado ou camelizado da invenção, respectivamente, podem ser projetados e logo sintetizados de novo utilizando técnicas para síntese de peptídeo conhecida por si. Também, baseado na seqüência aminoácida ou a seqüência de nucleotídeos de um domínio VHH de ocorrência natural ou o domínio VH, respectivamente, uma seqüência de nucleotídeos que codifica o desejado Nanobody humanizado ou camelizado da invenção, respectivamente, podem ser projetados e logo sintetizados de novo utilizando técnicas síntese ácida para nucléica conhecida por si, depois o qual a seqüência de nucleotídeos portanto obtida pode ser expressa em uma maneira conhecida por si para fornecer o Nanobody desejado da invenção.

Outros caminhos convenientes e técnicas para obter nanocorpos da invenção e/ou seqüências de nucleotídeos e/ou ácidos nucléicos que codificam o mesmo, que começa (da seqüência aminoácida de) domínios VH que ocorrem

naturalmente ou preferivelmente os domínios de VHH e/ou de seqüências de nucleotídeos e/ou seqüências ácidas nucléicas que codificam o mesmo serão claros para a pessoa experimentada, e pode, por exemplo, compreendendo combinar
5 uma ou várias seqüências aminoácidas e/ou seqüências de nucleotídeos de domínios VH que ocorrem naturalmente (como um ou vários FR'S e/ou CDR's) com uma ou várias uma ou várias seqüências aminoácidas e/ou seqüências de nucleotídeos de domínios VHH que ocorrem naturalmente (um
10 ou vários FR'S ou CDR's), em uma maneira conveniente para fornecer (uma seqüência de nucleotídeos ou codificação de ácido nucléica) um Nanobody da invenção.

Segundo um aspecto preferencial, mas não-restritivo do aspecto da invenção, um Nanobody no seu sentido mais amplo
15 pode ser geralmente definido como um polipeptídeo compreendendo:

a) uma seqüência aminoácida que é compreendida de quatro regiões/seqüências de armação interrompidas por três regiões/seqüências que determinam complementaridade, nas
20 quais o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é Q; e/ou:

b) uma seqüência aminoácida que é compreendida de quatro regiões/seqüências de armação interrompidas por três regiões/seqüências que determinam complementaridade, nas
25 quais o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é E e no qual o resíduo aminoácido na posição 45 segundo a numeração de Kabat é um R;

e/ou:

c) uma seqüência aminoácida que é compreendida de quatro regiões/seqüências de armação interrompidas por três regiões/seqüências que determinam complementaridade, nas
5 quais o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de P, R e S, e é especialmente escolhido do grupo composto de R e S.

Portanto, em um primeiro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

10 FR1-CDRI - FR2 - CDR2 - FR3-CDR3-FR4

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e em que CDR a CDR3 me refiro à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e
15 em que

i) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é Q; e/ou em que:

ii) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é E e no qual o resíduo aminoácido na
20 posição 45 segundo a numeração de Kabat é um R;

e/ou em que:

iii) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de P, R e S, e especialmente escolhido do grupo composto de R e S;

25 e em que:

iv) O CDR 1 é uma seqüência aminoácida que é escolhida do grupo composto das seqüências aminoácidas

seguintes:

NYGMG [SEQ ID NO: 15] SYTLG [SEQ ID NO: 16] NYNMG [SEQ
ID NO: 17] SSAMA [SEQ ID NO: 18] YYNTG [SEQ ID NO: 19] IGAMG
[SEQ ID NO: 20] IGTMG [SEQ ID NO: 21]

5 YNPMG [SEQ ID NO: 22]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm
pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais
preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente
pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido
10 na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima
mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente
uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
na presente); e/ou

15 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s)
aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
20 têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas
acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente
uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
25 na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou

inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

v) O CDR 2 é uma seqüência aminoácida que é
5 escolhida do grupo composto das seqüências aminoácidas seguintes:

SISWSGTYTAYSDNVKG [SEQ ID n. 23] GISWSGVSTDYAEFAKG
[SEQ ID n. 24] TSISWSGSYTAYADNVKG [SEQ ID n. 25]
SISWSGMSTYYTDSVKG [SEQ ID n. 26] TITSGGRTSYADSVKG [SEQ ID n.
10 27] AISWSGGLTYADSVKG [SEQ ID n. 28] TITSGGSTNYADPVKG [SEQ
ID n. 29] TITSGGSTNYADSVKG [SEQ ID n. 30] AISRTGGSTYYARSVEG
[SEQ ID n. 31] AISRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID n. 32]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm
pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais
15 preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente
pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido
na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima
mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente
20 uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s)
25 aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme

definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

10 e em que:

vi) O CDR 3 é uma seqüência aminoácida que é escolhida do grupo composto das seqüências aminoácidas seguintes:

15 QSRYSNYYDHDDKYAY [SEQ ID n. 33] LGRYRSNWRNIGQYDY [SEQ ID n. 34] QSRYSNYYDHDDKYAY [SEQ ID n. 35] SNRYRTHHTQAMYN [SEQ ID n. 36] VVDGKRAP [SEQ ID n. 37] NRRQKTVQMGERAYDY [SEQ ID n. 38] NLKQGSYGYRFNDY [SEQ ID n. 39] NLKQGDYGYRFNDY [SEQ ID n. 40] AGVRAEDGRVRTLPSEYNF [SEQ ID n. 41] AGVRAEDGRVRTLPSEYTF [SEQ ID n. 42] AGVRAEDGRVRSLPSEYTF [SEQ ID n. 43]

20 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente

uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

Preferivelmente, nos nanocorpos da invenção:

quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) NYGMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1)

SISWSGTYTAYSDNVKG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) QSRYSNYYDHDDKYAY; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) SYTLG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) GISWSGVSTDYAEFAKG; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo

menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) LGRYRSNWRNIGQYDY; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) NYGMG; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) TSISWSGSYTAYADNVKG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência

aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) QSRYSNYYDHDDKYAY; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) NYNMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) SISWSGMSTYYTDSVKG; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a

referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) SNRYRTHTTQAMVNY; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) SSAMA; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) TITSGGRTSYADSVKG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1)

VVDGKRAP; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo

menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) 5 seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;

quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) YYNTG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, 10 preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme 15 definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) AISWSGGLTYADSVKG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente 20 pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo 25 composto (de 1) eNRRQKTVQMGERAYDY; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais

preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99%
(conforme definido na presente) com a referida seqüência
aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só
1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na
5 presente) com a referida seqüência aminoácida;

- quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1)
IGAMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%,
preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo
menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade
10 de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a
referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas
que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;
então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1)
15 TITSGGSTNYADPVKG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo
menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais
preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente
pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido
na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3)
20 seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s)
aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a
referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo
composto (de 1) NLKQGSYGYRFNDY; (2) as seqüências de
aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo
25 menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais
preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99%
(conforme definido na presente) com a referida seqüência

aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;

- quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) IGAMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) TITSGGSTNYADSVKG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) NLKQGSYGYRFNDY; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na

presente) com a referida seqüência aminoácida;

- quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) IGAMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;

5 então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) TITSGGSTNYADSVKG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido

10 na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) NLKQGDYGYRFNDY; (2) as seqüências de

15 aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só

20 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) IGTMG; (2) seqüências

25

aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) TITSGGSTNYADSVKG; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) NLKQGDYGYRFNDY; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;

quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) YNPMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade

de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;

5 então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) AISRTGGSTYYARSVEG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido

10 na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) AGVRAEDGRVRTLPSEYNF; (2) as seqüências de

15 aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só

20 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) YNPMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais

25 preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 2 ou só I

"diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) AISRTGGSTYYPDSVEG; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%,
5 preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
10 definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente
15 pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;

20 - quando CDR1 é escolhido do grupo composto (de 1) YNPMG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas
25 que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida;

então o CDR2 é escolhido do grupo composto (de 1) AISRTGGSTYYPSVEG; (2) seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e o CDR3 é escolhido do grupo composto (de 1) AGVRAEDGRVRSPLPSEYTF; (2) as seqüências de aminoácido que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; e (3) seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com a referida seqüência aminoácida; no qual (1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

Especialmente, um Nanobody contra vWF segundo a invenção pode ter a estrutura:

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação I a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, 5 respectivamente, e em que

i) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é Q; e/ou em que:

ii) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é E e no qual o resíduo aminoácido na 10 posição 45 segundo a numeração de Kabat é um R;

e/ou em que:

iii) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de P, R e S, e especialmente escolhido do grupo composto de R e S;

15 e em que:

iv) O CDR 1 é uma seqüência aminoácida que é escolhida do grupo composto das seqüências aminoácidas seguintes:

20 NYGMG [SEQ ID n. 15] SYTLG [SEQ ID n. 16] NYNMG [SEQ ID n. 17] SSAMA [SEQ ID n. 18] YYNTG [SEQ ID n. 19] IGAMG [SEQ ID n. 20] IGTMG [SEQ ID n. 21] YNPMG [SEQ ID n. 22]

e em que:

v) O CDR 2 é uma seqüência aminoácida que é escolhida do grupo composto das seqüências aminoácidas 25 seguintes:

SISWSGTYTAYSDNVKG [SEQ ID n. 23] GISWSGVSTDYAEFAKG [SEQ ID n. 24] TSISWSGSYTAYADNVKG [SEQ ID n. 25]

SISWSGMSTYYTDSVKG [SEQ ID n. 26] TITSGGRTSYADSVKG [SEQ ID n. 27] AISWSGGLTYADSVKG [SEQ ID n. 28] TITSGGSTNYADPVKG [SEQ ID n. 29] TITSGGSTNYADSVKG [SEQ ID n. 30] AISRTGGSTYYARSVEG [SEQ ID n. 31] AISRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID n. 32]

5 e em que:

vi) O CDR 3 é uma seqüência aminoácida que é escolhida do grupo composto das seqüências aminoácidas seguintes:

QSRYSNYYDHDDKYAY [SEQ ID n. 33]

10 LGRYRSNWRNIGQYDY [SEQ ID n. 34] QSRYSNYYDHDDKYAY [SEQ ID n. 35] SNRYRTHTTQAMINY [SEQ ID n. 36] VVDGKRAP [SEQ ID n. 37] NRRQKTVMGERAYDY [SEQ ID n. 38] NLKQGSYGYRFNDY [SEQ ID n. 39] NLKQGDYGYRFNDY [SEQ ID n. 40] AGVRAEDGRVRTLPSEYNF [SEQ ID n. 41] AGVRAEDGRVRTLPSEYTF [SEQ ID n. 42]
15 AGVRAEDGRVRTLPSEYTF [SEQ ID n. 43] Preferivelmente, nos nanocorpos da invenção segundo o último aspecto:

- Quando CDR1 is:NYGMG; então CDR2 is:SISWSGTYTAYSDNVKG; e CDR3 is:QSRYSNYYDHDDKYAY

Quando CDR1 is:SYTLG; então CDR2 is:GISWSGVSTDYAEFAKG;
20 e CDR3 is:LGRYRSNWRNIGQYDY

- Quando CDR1 is:NYGMG; então CDR2 is:TSISWSGSYTAYADNVKG; e CDR3 is:QSRYSNYYDHDDKYAY

- Quando CDR1 is:NYNMG; então CDR2 is:SISWSGMSTYYTDSVKG; e CDR3 is:SNRYRTHTTQAMINY

25 Quando CDR1 is:SSAMA; então CDR2 is:TITSGGRTSYADSVKG; e CDR3 is:VVDGKRAP

Quando CDRI is:YYNTG; então CDR2 is:AISWSGGLTYADSVKG;

e CDR3 is:NRRQKTVQMGERAYDY

Quando CDRI is:IGAMG; então CDR2 is:TITSGGSTNYADPVKG;

e CDR3 is:NLKQGSYGYRFNDY

Quando CDR1 is:IGAMG; então CDR2 is:TITSGGSTNYADSVKG;

5 e CDR3 is:NLKQGSYGYRFNDY

Quando CDR1 is:IGAMG; então CDR2 is:TITSGGSTNYADSVKG;

e CDR3 is:NLKQGDYGYRFNDY

Quando CDR1 is:IGTMG; então CDR2 é: T1TSGGSTNYADSVKG;

e CDR3 is:NLKQGDYGYRFNDY

10 Quando CDR1 is:YNPMG; então CDR2 is:AISRTGGSTYYARSVEG;

e CDR3 is:AGVRAEDGRVRTLPSEYNF

- Quando CDR1 is:YNPMG; CDR2:AISRTGGSTYYPDSVEG; e
CDR3 is:AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

Quando CDR1 is:YNPMG; então CDR2 is:AISRTGGSTYYPDSVEG;

15 e CDR3 is:AGVRAEDGRVRSPLPSEYTF

Especialmente, segundo um aspecto preferencial, mas não-restritivo do aspecto da invenção, um Nanobody pode ser geralmente definido como um polipeptídeo que compreende uma seqüência aminoácida que é compreendida de quatro
20 regiões/seqüências de armação interrompidas por três regiões/seqüências que determinam complementaridade, em que;

o a-1) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de G, E, D, G, Q, R, S, L; e é preferivelmente escolhido do grupo
25 composto de G, E ou Q; e

o a-2) o resíduo aminoácido na posição 45 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de L, R ou

C; e é preferivelmente escolhido do grupo composto de L ou R; e

o a-3) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de W, R ou S; e é preferivelmente W ou R, e é mais preferivelmente W;

o a-4) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é Q; ou em que:

o b-1) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de E e Q; e

o b-2) o resíduo aminoácido na posição 45 segundo a numeração de Kabat é R; e

o b-3) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de W, R e S; e é preferivelmente W;

o b-4) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de Q e L; e é preferivelmente Q; ou em que:

o c-1) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de G, E, D, Q, R, S e L; e é preferivelmente escolhido do grupo composto de G, E e Q; e

o c-2) o resíduo aminoácido na posição 45 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de L, R e C; e é preferivelmente escolhido do grupo composto de L e R; e

o c-3) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de P, R e

S; e é especialmente escolhido do grupo composto de R e S; e

o c-4) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é

escolhido do grupo composto de Q e L; é preferivelmente Q.

Portanto, num outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

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

no qual FRI a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que:

i) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de G, E, D, G, Q, R, S, L; e é preferivelmente escolhido do grupo composto de G, E ou Q;

e em que:

o ii) o resíduo aminoácido na posição 45 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de L, R ou C; e é preferivelmente escolhido do grupo composto de L ou R;

e em que:

o iii) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de W, R ou S; e é preferivelmente W ou R, e é mais preferivelmente W;

e em que

iv) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é Q; e em que:

v) O CDRI, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima. num outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode

tenha a estrutura

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação I a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade I a 3, respectivamente, e em que:

i) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de E e Q;

e em que:

ii) o resíduo aminoácido na posição 45 segundo a numeração de Kabat é R; e em que:

iii) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de W, R e S; e é preferivelmente W;

e em que:

iv) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo a numeração de Kabat é Q;

e em que:

vi) O CDRI, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

No outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que:

i) o resíduo aminoácido na posição 44 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de G, E, D, Q, R, S e L; e é preferivelmente escolhido do grupo composto de G, E e Q;

e em que:

o ii) o resíduo aminoácido na posição 45 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de L, R e C; e é preferivelmente escolhido do grupo composto de L e R;

e em que:

o iii) o resíduo aminoácido na posição 103 segundo a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de P, R e S; e é especialmente escolhido do grupo composto de R e S;

e em que:

iv) o resíduo aminoácido na posição 108 segundo

a numeração de Kabat é escolhido do grupo composto de Q e L; é preferivelmente Q; e em que:

v) O CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

Dois grupos em particular preferidos, mas não-restritivos dos nanocorpos da invenção são aqueles segundo o a) acima; segundo o a-1) a a-4) acima; segundo o b)

em cima; segundo o b-1) a b-4) acima; segundo o c) acima; e/ou segundo o c-1) a

c-4) acima, em que;

a) os resíduos aminoácidos nas posições 44-47 segundo a numeração de Kabat formam a seqüência GLEW (ou uma seqüência semelhante a GLEW conforme definido na presente) e o resíduo aminoácido na posição 108 é Q;

ou em que:

b) os resíduos aminoácidos nas posições 43-46 segundo a numeração de Kabat formam a seqüência KERE ou KQRE (ou uma seqüência semelhante a KERE) e o resíduo aminoácido na posição 108 é Q ou L, e é preferivelmente Q.

Portanto, num outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a

4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade I a 3, respectivamente, e em que:

5 i) os resíduos aminoácidos nas posições 44-47 segundo a numeração de Kabat formam a seqüência GLEW (ou uma seqüência semelhante a GLEW conforme definido na presente) e o resíduo aminoácido na posição 108 é Q;

e em que:

10 ii) CDRI, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

No outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um 15 Nanobody da invenção pode ter a estrutura

FR1 - CDR I - FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à 20 regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que:

i) os resíduos aminoácidos nas posições 43-46 segundo a numeração de Kabat formam a seqüência KERE ou KQRE (ou uma seqüência semelhante a KERE) e o resíduo aminoácido na 25 posição 108 é Q ou L, e é preferivelmente Q;

e em que:

ii) O CDRI, CDR2 e CDR3 são tão definidos na

presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

5 Nos nanocorpos da invenção na qual os resíduos aminoácidos nas posições 43-46 segundo a numeração de Kabat formam a seqüência KERE ou KQRE, o resíduo aminoácido na posição 37 é o mais preferivelmente F. nos nanocorpos da invenção na qual os resíduos aminoácidos nas posições 44-47
10 segundo a numeração de Kabat formam a seqüência GLEW, o resíduo aminoácido na posição 37 é escolhido do grupo composto de Y, H, I, V ou F, e é mais preferivelmente F.

 Portanto, sem ser limitado a isto de qualquer modo, com base nos resíduos aminoácidos presentes nas posições
15 acima mencionadas, os nanocorpos da invenção podem ser geralmente classificados com base nos três grupos seguintes:

 a) "O GLEW-grupo": nanocorpos com a seqüência aminoácida GLEW nas posições 44-47 segundo a numeração de Kabat e Q na posição 108 segundo a numeração de Kabat.
20 Conforme mais adiante descrito na presente, nanocorpos dentro deste grupo normalmente têm um V na posição 37, e podem ter um W, P, R ou S na posição 103, e preferivelmente ter um W na posição 103. O grupo GLEW também compreende algumas seqüências semelhantes a GLEW como as mencionadas na
25 Tabela 2 mais adiante;

 b) "O Grupo KERE": nanocorpos com a seqüência aminoácida KERE ou KQRE ou nas posições 43-46 segundo a

numeração de Kabat e Q ou L na posição 108 segundo a numeração de Kabat. Conforme mais adiante descrito na presente, nanocorpos dentro deste grupo normalmente têm um F na posição 37, um L ou F na posição 47; e podem ter um W, P, R ou S na posição 103, e preferivelmente ter um W na posição 103;

c) "Os 103 P, R, S-grupo": nanocorpos com um P R ou S na posição 103. Esses nanocorpos podem ter seqüência aminoácida GLEW nas posições 44-47 da numeração de Kabat ou a seqüência aminoácida KERE ou KQRE nas posições 43-46 segundo a numeração de Kabat, o último mais preferivelmente em combinação com um F na posição 37 e um L ou um F na posição 47 (conforme definido para o Grupo KERE); e podem ter Q ou L na posição 108 segundo a numeração de Kabat, e preferivelmente ter Q.

Portanto, num outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode ser um Nanobody que pertence ao GLEW-grupo (conforme definido na presente), e no qual CDR 1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

No outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode ser um Nanobody que pertence ao Grupo KERE (conforme definido na presente), e no qual CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente

conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

Portanto, num outro aspecto preferido, mas não-restritivo, um Nanobody da invenção pode ser um Nanobody que pertence aos 103 P, R, S-grupo (conforme definido na presente), e no qual CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

Também, mais geralmente e além dos resíduos 108Q, 43E/44R e 103P, R, S acima mencionados, os nanocorpos da invenção pode conter, em uma ou várias posições que, em um domínio VH convencional, formariam (parte de) a interface VH/VL, conteriam um ou vários resíduos aminoácidos que são mais altamente carregados do que os resíduos aminoácidos que ocorrem naturalmente na mesma posição(ões) no domínio VH ou VHH que ocorre naturalmente, e especialmente um ou vários resíduos aminoácidos carregados (como mencionado na Tabela 1).

Tais substituições incluem, mas não são limitadas às seqüências Semelhantes a GLEW mencionadas na Tabela 2 mais adiante; bem como as substituições que são descritas na Solicitação Internacional WO 00/29004 para assim chamados "microcorpos", p. ex. um Q na posição 108 e KLEW nas posições 44-47.

Nos nanocorpos da invenção, o resíduo aminoácido na posição 83 é escolhido do grupo composto de L, M, S, V e W; e é preferivelmente L.

Também, nos nanocorpos da invenção, o resíduo aminoácido na posição 83 é escolhido do grupo composto de R, K, N, E, I e Q; e é mais preferivelmente K ou E (para nanocorpos correspondentes a domínios VHH que ocorrem naturalmente) ou R (para nanocorpos "humanizados", conforme descrito mais adiante). O resíduo aminoácido na posição 84 é escolhido do grupo composto de P, A, R, S, D e V, e é mais preferivelmente P (para nanocorpos correspondentes a domínios VHH que ocorrem naturalmente) ou R (para nanocorpos "humanizados", conforme descrito mais adiante).

Além disso, nos nanocorpos da invenção, o resíduo aminoácido na posição 104 é escolhido do grupo composto de G e D; e é mais preferivelmente G.

Coletivamente, os resíduos aminoácidos nas posições 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 e 108, cujos nanocorpos são acima mencionados, também serão mencionados na presente como "os Resíduos de Hallmark". Os Resíduos de Hallmark e os resíduos aminoácidos nas posições correspondentes do domínio VH humano o mais estreitamente relacionado, VH3, são resumidos na Tabela 2.

Algumas combinações especialmente preferenciais desses Resíduos de Hallmark como ocorrem em domínios VHH que ocorrem naturalmente são mencionados na Tabela 3. Para a comparação, os correspondentes resíduos aminoácidos do VH3

humano chamado DP-47 foi indicada no itálico.

Tabela 2: Resíduos de Hallmark em nanocorpos

Posição	Humano V _H 3	Resíduo de Hallmarks
1	L, V; predominantemente L	L, M, S, V, W; preferivelmente L
3	V, I, F; usualmente V	F ⁽¹⁾ , Y, H, I ou V, preferivelmente F ⁽¹⁾ ou Y
4 ⁽⁸⁾	G	G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ , D, Q, R, S, L; preferivelmente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ ou Q; mais preferivelmente G ⁽²⁾ ou E ⁽³⁾ .
4	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , C, I, L, P, Q, V; preferivelmente L ⁽²⁾ ou R ⁽³⁾
4	W, Y	W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ ou F ⁽¹⁾ , A, G, I, M, R, S ou Y; preferivelmente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ , F ⁽¹⁾ ou R
3	R ou K; usualmente R	R, K ⁽⁵⁾ , N, E ⁽⁵⁾ , I, M ou Q; preferivelmente K ou R; mais preferivelmente K
4	A, T, D; predominantemente A	P ⁽⁵⁾ , A, L, R, S, D, V; preferivelmente P

03	1	W	W ⁽⁴⁾ , P ⁽⁶⁾ , R ⁽⁶⁾ , S; preferivelmente W
04	1	G	G ou D; preferivelmente G
08	1	L, M ou T; predominantemente L	Q, L ⁽⁷⁾ ou R; preferivelmente Q ou L ⁽⁷⁾

Notas:

(1): Especialmente, mas não exclusivamente, em combinação com KERE ou QRE nas posições 4346.

5 (2): Normalmente como GLEW nas posições 44-47.

(3): Normalmente como KERE ou QRE nas posições 43-46, p. ex. como KEREL, KEREF, QREL, QREF ou KEREG nas posições 43-47. Alternativamente, também as seqüências como TERE (por exemplo, TEREL), KECE (por exemplo, KECEL ou KECER), RERE
10 (por exemplo, REREG), QERE (por exemplo, QEREG), KGRE (por exemplo, KGREG), KDRE (por exemplo, KDREV) são possíveis. Alguns outras seqüências possíveis, mas menos preferenciais incluem, por exemplo, DECKL e NVCEL.

(4): Tanto com GLEW nas posições 44-47 como com
15 KERE ou QRE nas posições 43-46.

(5): Frequentemente como KP ou EP nas posições 83-84 de domínios VHH que ocorrem naturalmente.

(6): Especialmente, mas não exclusivamente, em combinação com GLEW nas posições 44-47.

20 (7): Com a prescrição que quando as posições 44-47 são GLEW, a posição 108 seja sempre Q.

(8): O grupo GLEW também contém GLEW-como seqüências nas posições 44-47, como para

exemplo GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP,

5 GPER, GLER e ELEW.

Tabela 3: Algumas combinações preferenciais de Resíduos de Hallmark em nanocorpos que ocorrem naturalmente.

Para a humanização dessas combinações, é feita referência à especificação.

10

	11	37	44	45	47	83	84		104	
										08
DP-47 (humano)	M	V	G	L	W	R	A	W	G	
"KERE" grupo	L	F	E	R	L	K	P	W	G	
	L	F	E	R	F	E	P	W	G	
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	
	L	Y	Q	R	L	K	P	W	G	
	L	F	L	R	V	K	P	Q	G	
	L	F	Q	R	L	K	P	W	G	
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	
"GLEW" grupo	L	V	G	L	W	K	S	W	G	
	M	V	G	L	W	K	P	R	G	

Nos nanocorpos, cada resíduo aminoácido em qualquer outra posição do que os Resíduos de Hallmark pode ser qualquer resíduo aminoácido que naturalmente ocorre na posição correspondente (segundo numeração de Kabat) de um domínio VHH de ocorrência natural.

Tais resíduos aminoácidos serão claros para a pessoa experimentada. As tabelas 4 - 7 mencionam alguns resíduos não-restritivos que podem estar presentes em cada posição (segundo numeração de Kabat) do FR1, FR2, FR3 e FR4 de domínios VHH que ocorrem naturalmente. Para cada posição, o resíduo aminoácido que mais freqüentemente ocorre em cada posição de um domínio VHH de ocorrência natural (e que é o resíduo aminoácido mais preferencial para a referida posição em um Nanobody) é indicada em negrito; e outros resíduos aminoácidos preferenciais para cada posição foram sublinhados (nota: o número de resíduos aminoácidos que são encontrados nas posições 2630 de domínios VHH que ocorrem naturalmente apóia a hipótese que é a base da numeração Chothia (supra) que os resíduos nessas posições já fazem parte de CDR1.)

Nas Tabelas 4 - 7, alguns resíduos não-restritivos que podem estar presentes em cada posição de um domínio VH3 humano também foram mencionados. Novamente, para cada posição, o resíduo aminoácido que mais freqüentemente ocorre em cada posição de um domínio VH3 humano que ocorre naturalmente é indicada em negrito; e outros resíduos aminoácidos preferenciais foram sublinhados.

Tabela 4: os exemplos não-restritivos dos resíduos aminoácidos em FR1 (para as notas, ver as notas à Tabela 2)

Pos.	Resíduo(s) Aminoácido(s):	
	Humano V _{H3}	Camelídeo V _{HH'} s
1	E, Q	Q, A, E, D, H, R
2	V	V, A, E, G, L, M, Q
3	Q	Q, K, E, H, P, R, Y
4	L	L, F, P, R, V
5	V, L	Q, E, L, V, M, P, A, I
6	E	E, D, Q, A, H
7	S, T	S, F, H
8	G, R	G, A, R
9	G	G, E
10	G, V	G, D, R, A, E, N, T, V
11	Resíduo de Hallmark: L, M, S, V, W, F, N, P, T, Y; preferivelmente L	
12	V, I	V, A, G, M
13	Q, K, R	Q, E, K, D, G, A, H, L, N, P, R, T
14	P	A, Q, A, G, P, T, V, E, F, I, N, S
15	G	G
16	G, R	G, A, E, D, N, P, R, S, V, W
17	S	S, F, T, N, P, A, C

18	L	L, V, M, Q, R
19	R, K	R, K, L, N, S, T, A, F, G, I, M, Q
20	L	L, F, I, V, M, S
21	S	S, F, T, G, H, P, A
22	C	C
23	A, T	A, D, P, S, T, V, E, G, I, L, Q, R
24	A	A, I, S, T, V, C, E, F, G, L, N, P, Q, Y

Tabela 4: exemplos não-restritivos de resíduos aminoácidos em FR1 (continua)

os.	Resíduo(s) Aminoácido(s):	
	Humano V _H 3	Camelídeo V _{HH} 's
5	S	S, A, F, P, T, L, V
6	G	G, D, E, R, S, V, A, I, M, P, T
7	F	S, F, R, L, P, G, N, A, D, E, H, I, K, M, Q, T, V, Y
8	T	N, T, E, D, S, I, R, A, G, R, F, Y, L, M, P, V
	F, V	F, L, D, S, I, G,

9		V, A, E, P, T, Y
0	S, D, G	N, S, E, G, A, D, M, T, H, I, P, R, V, W

Tabela 5: os exemplos não-restritivos dos resíduos aminoácidos em FR2 (para as notas, ver as notas à Tabela 2)

os.	Resíduo(s) Aminoácido(s):	
	Humano V _H 3	Camelídeo V _{HH} 's
6	W	W
7	Resíduo de Hallmark: F ⁽¹⁾ , Y, H, I, A, L, P, S ou V preferivelmente F ⁽¹⁾ ou Y	
8	R	R
9	Q	Q, H, P, R, A, D, G, L, E
0	A	A, F, G, P, T, V, I, L, N, R, S, Y
1	P, S, T	P, A, L, S, I, Q, T
2	G	G, E, D, R, T, V
3	K	K, D, E, N, Q, R, T, V, A, L, M, S

4	Resíduo de Hallmark: G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ , D, Q, R, S, L, A, F, K, M, N, P, V, W, Y; preferivelmente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ ou Q; mais preferivelmente G ⁽²⁾ ou E ⁽³⁾ .	
5	Resíduo de Hallmark: L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , C, I, L, P, Q, V, D, E, G, H, K, T; preferivelmente L ⁽²⁾ ou R ⁽³⁾	
6	E, V	E, D, K, Q, V, A, G, N
7	Resíduo de Hallmark: W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ ou F ⁽¹⁾ , A, G, I, M, R, S, D, E, H, K, Q, T, V ou Y; preferivelmente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ , F ⁽¹⁾ ou R	
8	V	V, I, L, A, C, E, F, G, H, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
9	S, A, G	A, S, A, G, T, V, D, E, I, L, Q, R, Y

Tabela 6: os exemplos não-restritivos dos resíduos aminoácidos em FR3 (para as notas, ver as notas à Tabela 2)

os.	Resíduo(s) Aminoácido(s):	
	Humano V _H 3	Camelídeo V _{HH'} s
6	R	R
7	F	F, L, V, A, D, I, S, Y
	T	T, A, S, D, F, G,

8		I, K, N
9	I	I, M, V, A, F, L, R, S, T
0	S	S, A, F, E, G, K, P, T, V
1	R	R, G, I, K, Q, S, T, W, A, F, L, M, N
2	D, E	D, E, G, N, V, A, H, I, L, Q, S, T
3	N, D, G	N, D, F, I, K, S, T, Y, A, G, H, L, M, R, V
4	A, S	A, D, G, N, P, S, T, F, H, I, L, R, V, Y
5	K	K, A, E, K, L, N, Q, R, D, G, I, M, S, T, V, W
6	N, S	N, D, K, R, S, T, Y, E, G, H, I, Q
7	S, T, I	T, A, E, I, M, S, K, L, N, R, V
8	L, A	V, L, A, F, G, I, M, E, N, Q, R, S, T, W
9	Y, H	Y, A, D, F, H, S, T, C, E, I, L, N, V, W
	L	L, F, V, M

0		
1	Q	Q, E, R, T, G, H, I, K, L, M, N
2	M	M, I, L, V, G, P, T
2a	N, G	N, D, G, H, S, T, A, E, I, K, R, V
2b	S	S, N, D, G, R, A, C, E, F, I, K, M, P, T, V
2c	L	L, P, M, T, V

Tabela 6: exemplos não-restritivos de resíduos aminoácidos em FR3 (continua)

os.	Resíduo(s) Aminoácido(s):	
	Humano V _{H3}	Camelídeo V _{HH'} s
3	Resíduo de Hallmark: R, K ⁽⁵⁾ , N, E ⁽⁵⁾ , I, M, A, D, G, L, Q, S, T ou Q; preferivelmente K ou R; mais preferivelmente K	
4	Resíduo de Hallmark: P ⁽⁵⁾ , A, L, R, S, D, V, F, G, H, N, T, Y; preferivelmente P	
5	E, G	E, D, G, Q, A, N, R, V, Y
	D	D, E, F, Y

6		
7	T, M	T, S, A, C, M
8	A	A, G, S, D, L, N, P
9	V, L	V, A, D, I, L, M, N, R, T, E, F, S
0	Y	Y, F, E, H, N
1	Y, H	Y, D, F, H, L, S, T, V, C, I, N, R, W
2	C	C
3	A, K, T	A, N, G, H, K, R, S, T, V, Y, E, F, I, L, M, Q
4	K, R, T	A, V, C, F, G, I, L, R, S, D, E, K, M, N, P, Q, T, W, Y T ou K;

Tabela 7: os exemplos não-restritivos dos resíduos aminoácidos em FR4 (para as notas, ver as notas à Tabela 2)

	Resíduo(s) Aminoácido(s):	
os.		
	Humano V _H 3	Camelídeo V _{HH'} s

03	Resíduo de Hallmark: W ⁽⁴⁾ , P ⁽⁶⁾ , R ⁽⁶⁾ , S, F, G, K, L, N, Q, V, Y; preferivelmente W	
04	Resíduo de Hallmark: G, A, R, S, T ou D; preferivelmente G	
05	Q, R	Q, E, K, P, R, G, H, L, S, V
06	G	G
07	T	T, A, I, N, P
08	Resíduo de Hallmark: Q, L ⁽⁷⁾ , E, H, N, P, T ou R; preferivelmente Q ou L ⁽⁷⁾	
09	V	V
10	T	T, I, A
11	V	V, A, I, G
12	S	S, F, A, L, P, T, Y
13	S	S, A, L, P, F, T

Portanto, num outro aspecto preferido, mas não restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

FRI - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que: i) os resíduos de Hallmark são como definidos na presente;

e em que:

ii) O CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima. Num outro aspecto preferido, mas não restritivo, um Nanobody da invenção pode ter o

estrutura

15

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que: e em que

20

i) O FR1 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

25

[1] QVQLQESGGGXVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID n. 1]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm

pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a seqüência aminoácida acima; em que

5 (1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 4; e/ou

10 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
15 têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
20 posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 4; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
25 contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

ii) O FR2 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

[36] WXRQAPGKXXEXVA [49] [SEQ ID n. 2]

5

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a seqüência aminoácida acima; em que

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 5; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma

25

substituição aminoácida conforme definido na Tabela 5; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

iii) O FR3 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

[66] RFTISRDNAKNTVYVLQMNSLXXEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID n. 3]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a seqüência aminoácida acima; em que

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que

têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
5 posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
10 contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

iv) O FR4 é escolhido do grupo composto da
15 seqüência aminoácida:

[103] XXQGTXVTVSS [113] [SEQ ID n. 4]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm
20 pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a seqüência aminoácida acima; em que

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
25 posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma

substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas,

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

v) O CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima;

no qual os Resíduos de Hallmark são indicados "por X" e como definidos mais acima e no qual os números entre colchetes se referem às posições aminoácidas segundo a

numeração de Kabat.

Num outro aspecto preferido, mas não restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, 10 respectivamente, e em que: e em que

i) O FR1 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID n. 5]

15 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a seqüência aminoácida acima; em que

20 (1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 4; e/ou

25 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s)

aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) o resíduo de Hallmark na posição é como indicado na seqüência acima;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 4; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) o resíduo de Hallmark na posição é como indicado na seqüência acima; e em que:

ii) O FR2 é escolhido do grupo composto das seqüências aminoácidas:

[36] WFRQAPGKERELVA [49] [SEQ ID n. 6] [36]
 WFRQAPGKEREFVA [49] [SEQ ID n. 7] [36] WFRQAPGKEREGA [49]
 [SEQ ID n. 8] [36] WFRQAPGKQRELVA [49] [SEQ ID n. 9] [36]
 WFRQAPGKC~REFVA [49] [SEQ ID n. 10] [36] WYRQAPGKGLEWA [49]
 [SEQ ID n. 11]

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

5 (3) os resíduos de Hallmark nas posições 37, 44, 45 e 47 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

iii) O FR3 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

10

[66] RFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID n. 12]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com a seqüência aminoácida acima; em que

20 (1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 83 e 84 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 83 e 84 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

iv) O FR4 é escolhido do grupo composto das seqüências aminoácidas:

[103] WGQGTQVTVSS [113] [SEQ ID n. 13]

[103] WGQGTLVTVSS [113] [SEQ ID n. 14]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente

pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima; em que

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
5 posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
10 contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 103, 104 e 108 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
15 têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
20 posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
25 contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 103, 104 e 108 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

v) O CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e estão preferivelmente como definido segundo uma das definições preferenciais acima, e estão mais preferivelmente como definido segundo uma das definições mais preferenciais acima.

Num outro aspecto preferido, mas não restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que: e em que

i) O FR1 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

20

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID n. 5]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra

posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 4; e/ou

5 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) o resíduo de Hallmark na posição é como indicado
10 na seqüência acima; e em que:

o ii) FR2 é escolhido do grupo composto das seqüências aminoácidas:

[36] WFRQAPGKERELVA [49] [SEQ ID n. 6] [36]
15 WFRQAPGKEREFVA [49] [SEQ ID n. 7] [36] WFRQAPGKEREGA [49]
[SEQ ID n. 8] [36] WFRQAPGK~RELVA [49] [SEQ ID n. 9] [36]
WFRQAPGKQREFVA [49] [SEQ ID n. 10]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
20 têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
posição que não seja uma posição de Hallmark é
25 preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 5; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

5 (3) os resíduos de Hallmark nas posições 37, 44, 45 e 47 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

o iii) FR3 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

10

[66] RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID n. 12]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que 15 têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é 20 preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou 25 inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 83 e 84 são

como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

o iv) FR4 é escolhido do grupo composto das seqüências aminoácidas:

5

[103] WGQGTQVTVSS [113] [SEQ ID n. 13]

[103] WGQGLVTVSS [113] [SEQ ID n. 14]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
10 têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas
acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
posição que não seja uma posição de Hallmark é
15 preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida
conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma
substituição aminoácida conforme definido na Tabela 7; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
20 inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s)
aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 103, 104 e
108 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

25 v) O CDR1, CDR2 e CDR3 são conforme definido na
presente, e são preferivelmente conforme definidos segundo
uma das definições preferenciais acima, e estão mais

preferivelmente como definido segundo uma das definições mais preferenciais acima.

Num outro aspecto preferido, mas não restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

5

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

no qual FR1 a FR4 se referem a regiões de armação 1 a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que:

10

i) O FR1 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID n. 5]

15

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

20

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 4; e/ou

25

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s)

aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) o resíduo de Hallmark na posição é como indicado na seqüência acima; e em que:

ii) O FR2 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

[36] WYRQAPGKGLEWA [49] [SEQ ID n. 11]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 5; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 37, 44, 45 e 47 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

iii) O FR3 é escolhido do grupo composto da seqüência aminoácida:

[66] RFTISRDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID n.
12]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
5 têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas
acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
posição que não seja uma posição de Hallmark é
10 preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida
conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma
substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
15 inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s)
aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 83 e 84 são
como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

20 iv) O FR4 é escolhido do grupo composto da
seqüência aminoácida:

[103] WGQGT (QVTVSS [113] [SEQ ID n. 13]

25 e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas

acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 7; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 103, 104 e 108 são como indicados em cada uma das seqüências acima;

e em que:

v) O CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e estão preferivelmente como definido segundo uma das definições preferenciais acima, e são mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

Num outro aspecto preferido, mas não restritivo, um Nanobody da invenção pode ter a estrutura

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

no qual FRI a FR4 se referem a regiões de armação I a 4, respectivamente, e no qual CDR1 a CDR3 se referem à regiões que determinam complementaridade 1 a 3, respectivamente, e em que: e em que

i) O FR1 é escolhido do grupo composto de seqüências FR1 presentes nos nanocorpos de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, e especialmente nos nanocorpos humanizados de SEQ ID NO's 86 para 97, ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%,
5 preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma de ditas seqüências FRI; no qual (1) qualquer substituição
10 aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é

preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente)

e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na
15 Tabela 4; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com a referida seqüência FR1; e

20 (3) o resíduo de Hallmark na posição é como indicado na referida seqüência FR1;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das referidas seqüências FR1,
25 em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é

preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 4; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com a referida seqüência FR1; e (3) o resíduo de Hallmark na posição é como indicado na referida seqüência FR1;

e em que:

ii) O FR2 é escolhido do grupo composto das seqüências FR2 presentes nos nanocorpos de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, e especialmente nos nanocorpos humanizados de 1o NO's SEQ 86 para 97, ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das referidas seqüências FR2; no qual (1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é

preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente)

e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 5; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com a referida

seqüência FR2; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 37, 44, 45 e 47 são como indicados na referida seqüência FR2;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
5 têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
definido na presente) com uma das referidas seqüências FR2,
em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
posição que não seja uma posição de Hallmark é
10 preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida
conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma
substituição aminoácida conforme definido na Tabela 5; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
15 inserções aminoácidas, em comparação com a referida
seqüência FR2; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 37, 44, 45 e
47 são como indicados na referida seqüência FR2;

e em que:

20 o iii) FR3 é escolhido do grupo composto das
seqüências FR3 presentes nos nanocorpos de SEQ ID NO's 60
para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, e especialmente nos
nanocorpos humanizados de SEQ ID NO's 86-97,

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm
25 pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais
preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente
pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido

na presente) com uma das referidas seqüências FR3; no qual
(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
posição que não seja uma posição de Hallmark é
preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida
5 conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma
substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
inserções aminoácidas, em comparação com a referida
10 seqüência FR3; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 83 e 84 são
como indicados na referida seqüência FR3;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
têm 3, 2 ou só I "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
15 definido na presente) com uma das referidas seqüências FR3,
em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra
posição que não seja uma posição de Hallmark é
preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida
20 conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma
substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
inserções aminoácidas, em comparação com a referida
25 seqüência FR3; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 83 e 84 são
como indicados na referida seqüência FR3;

e em que:

iv) O FR4 é escolhido. do grupo composto das seqüências FR4 presentes nos nanocorpos de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, e especialmente nos
5 nanocorpos humanizados de SEQ ID NO's 86 para 97, ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos
10 identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das referidas seqüências FR4; no qual (1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é

preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma
15 substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com a referida seqüência FR4; e

20 (3) os resíduos de Hallmark nas posições 103, 104 e 108 são como indicados na referida seqüência FR3;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das referidas seqüências FR4,

25 em que:

(1) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é

preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida conforme definido na Tabela 6; e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com a referida seqüência FR4; e

(3) os resíduos de Hallmark nas posições 103, 104 e 108 são como indicados na referida seqüência FR4;

10 e em que:

v) O CDR1, CDR2 e CDR3 são tão definidos na presente, e preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições preferenciais acima, e mais preferivelmente conforme definidos segundo uma das definições mais preferenciais acima.

Alguns nanocorpos particularmente preferidos da invenção podem ser escolhidos do grupo composto das seqüências aminoácidas de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, e especialmente nos nanocorpos humanizados de SEQ ID NO's 86 para 97 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97 (e preferivelmente de SEQ ID NO's 86 para 97); em que

(1) os resíduos de Hallmark podem ser como indicados

na Tabela 2 acima;

(2) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida como definido em Tabelas 4-7; e/ou

(3) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

Alguns nanocorpos até mais particularmente preferidos da invenção podem ser escolhidos do grupo composto das seqüências aminoácidas de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, e especialmente nos nanocorpos humanizados de SEQ ID NO's 86 para 97 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97 (e preferivelmente de SEQ ID NO's 86 para 97); em que

(1) os resíduos de Hallmark são como indicados na seqüência pertinente escolhida de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97 (e preferivelmente de SEQ ID NO's 86 para 97);

(2) qualquer substituição aminoácida em qualquer outra posição que não seja uma posição de Hallmark é

preferivelmente qualquer uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente) e/ou uma substituição aminoácida como definido em Tabelas 4-7; e/ou

(3) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com a seqüência pertinente escolhida de 10 NO's SEQ 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97 (e preferivelmente de SEQ ID NO's 86 para 97).

Alguns nanocorpos mais preferenciais da invenção podem ser escolhidos do grupo composto das seqüências aminoácidas de SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, e especialmente dos nanocorpos humanizados de SEQ ID NO's 86 para 97.

Como ficará claro do acima mencionado, o termo nanocorpos da invenção como usado na presente no seu sentido mais amplo também compreende mutantes naturais ou sintéticos, variantes, alelos, análogos e ortólogos (a seguir tratados coletivamente como "análogos") dos nanocorpos mencionado no SEQ ID NO's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97.

Geralmente, tais análogos, por exemplo, podem compreender seqüências homólogas, porções funcionais, ou uma porção funcional de uma seqüência homóloga (conforme posteriormente definido mais adiante) de um Nanobody. Geralmente, em tais análogos, cada resíduo aminoácido (outro que não o Resíduo de Hallmark) em cada uma das regiões de armação pode ser substituído por qualquer outro resíduo

aminoácido, contanto que o grau total da identidade de seqüência das regiões de armação permaneça conforme definido na presente. Preferivelmente, contudo, em tais análogos:

um ou resíduos aminoácidos nas acima mencionadas seqüências de armação são substituídos por um ou vários resíduos aminoácidos que ocorrem naturalmente na mesma posição em um domínio VHH que ocorre naturalmente. Alguns exemplos de tais substituições são mencionados em Tabelas 4-7 acima;

10 e/ou:

um ou resíduos aminoácidos nas acima mencionadas seqüências de armação são substituídos por um ou vários resíduos aminoácidos que podem ser considerados uma substituição aminoácida "conservadora", conforme descrito mais acima;

e/ou:

um ou resíduos aminoácidos nas acima mencionadas seqüências de armação são substituídos por um ou vários resíduos aminoácidos que ocorrem naturalmente na mesma posição em uma naturalmente ocorrência o domínio de Vii de um ser humano. Isto é, "a humanização" geralmente tratada como da naturalmente ocorrência VHH/Nanobody em geral e da referida posição especialmente, e será discutido mais detalhadamente a seguir;

25 e:

as posições para que só um resíduo aminoácido é mencionado para ambos o domínio VH

e o domínio VHH em Tabelas 4 - 7 anteriormente não é preferivelmente substituído.

Também, embora geralmente menos preferencial, em tais análogos, um ou vários resíduos aminoácidos possam ser eliminados das regiões de armação e/ou inseridos nas regiões de armação (opcionalmente além de uma ou várias substituições aminoácidas conforme acima mencionado), contanto que o grau total da identidade de seqüência das regiões de armação permaneça conforme definido na presente.

Os resíduos de Hallmark não devem ser eliminados. Também, o mais preferivelmente, resíduos aminoácidos para os quais só um resíduo aminoácido é mencionado tanto para o domínio VH como para o domínio VHH nas Tabelas 4 - 7 acima não são preferivelmente eliminados.

Preferivelmente, tais análogos devem ser tais que eles ainda podem ligar a, ter afinidade para e/ou ter especificidade para vWF, isto é, com uma afinidade e/ou uma especificidade que é pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mesmo mais preferivelmente pelo menos 80%, como pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99% ou mais, da afinidade e/ou a especificidade de pelo menos um dos nanocorpos de SEQ ID No's 60 para 73 e SEQ ID NO's 86 para 97, conforme determinado utilizando um ensaio conveniente, por exemplo, um ensaio para determinar a ligação do análogo a vWF, e em particular um dos ensaios conforme usados nos Exemplos apresentados posteriormente.

Geralmente, tais análogos, por exemplo, podem ser obtidos fornecendo um ácido nucléico que codifica um domínio VHH de ocorrência natural, modificando os codons para um ou vários resíduos aminoácidos que devem ser humanizados nos codons para o(s) resíduo(s) aminoácido(s) humano(s) correspondente(s), expressando a seqüência ácida/nucleotídea nucléica portanto obtida em um hospedeiro ou sistema de expressão conveniente; e opcionalmente isolamento e/ou purificação do análogo portanto obtido para prover o referido análogo na forma essencialmente isolada (conforme definido acima). Isto pode ser geralmente executado usando métodos e técnicas conhecidas por si, o que ficará claro para a pessoa experimentada, por exemplo, dos manuais e referências citadas na presente e/ou da nova descrição a seguir. Alternativamente, e por exemplo, um ácido nucléico que codifica um análogo pode ser sintetizado em uma maneira conhecida por si (por exemplo, usando um aparelho automatizado que sintetiza seqüências ácidas nucléicas com uma seqüência aminoácida predestinada) e pode ser expresso em um hospedeiro ou sistema de expressão conveniente, sobre o qual o análogo portanto obtido pode ser opcionalmente isolado e/ou purificado para prover os referidos análogos na forma essencialmente isolada (conforme definido acima). Outro modo de fornecer os análogos implica a síntese química da seqüência aminoácida pertinente que usa técnicas para síntese de peptídeo conhecida por si, como as mencionadas a seguir.

Será também geralmente ser claro para a pessoa experimentada que nanocorpos (inclusive análogos dos mesmos) também podem ser preparados começando de seqüências VH humanas (isto é, seqüências aminoácidas ou as seqüências de nucleotídeos correspondentes), como seqüências VH3, por exemplo, humanas como DP-47, DP-51 ou DP-29, modificando um ou vários resíduos aminoácidos na seqüência aminoácida do referido domínio VH humano, para fornecer uma seqüência aminoácida que tem a um Q na posição 108; e/ou (b) E na posição 44 e/ou R na posição 45, e preferivelmente E na posição 44 e R na posição 45; e/ou (c) P, R ou S na posição 103, conforme descrito acima. Novamente, isto pode ser geralmente executado usando vários métodos e técnicas mencionadas no parágrafo prévio, usando uma seqüência aminoácida e/ou seqüência de nucleotídeos para um domínio VH humano como um ponto de partida.

O termo nanocorpos conforme usado na presente no seu sentido mais amplo também compreende partes ou fragmentos dos nanocorpos (inclusive análogos) da invenção tão definida na presente, que pode ser novamente conforme adicionalmente descrito mais adiante.

Geralmente, as partes ou os fragmentos dos nanocorpos e/ou análogos têm seqüências aminoácidas nas quais, em comparação com a seqüência aminoácida do Nanobody ou análogo de comprimento completo correspondente, um ou vários dos resíduos aminoácidos no fim do N-terminal, um ou vários resíduos aminoácidos no fim do C-terminal, um ou vários

resíduos aminoácidos internos contíguos, ou qualquer combinação dos mesmos, foram eliminados e/ou retirados. É também possível combinar uma ou várias de tais partes ou fragmentos para fornecer um Nanobody da invenção.

5 Preferivelmente, a seqüência aminoácida de um Nanobody que compreende uma ou várias partes ou fragmentos de um Nanobody e/ou análogo de comprimento completo deve ter um grau de identidade de seqüência de pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo
10 menos 70%, como pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95%, com a seqüência aminoácida do correspondente Nanobody de comprimento completo.

Também, a seqüência aminoácida de um Nanobody que compreende uma ou várias partes ou fragmentos de um Nanobody
15 e/ou análogo de comprimento completo é preferivelmente tal que compreende pelo menos 10 resíduos aminoácidos contíguos, preferivelmente pelo menos 20 resíduos aminoácidos contíguos, mais preferivelmente pelo menos 30 resíduos aminoácidos contíguos, como pelo menos 40 resíduos
20 aminoácidos contíguos, da seqüência aminoácida do correspondente Nanobody de comprimento completo.

Geralmente, tais partes ou fragmentos dos nanocorpos da invenção terão seqüências aminoácidas nas quais, em comparação com a seqüência aminoácida do correspondente
25 Nanobody de comprimento completo da invenção, um ou vários dos resíduos aminoácidos no fim do N-terminal, um ou vários resíduos aminoácidos no fim do C-terminal, um ou vários

resíduos aminoácidos internos contíguos, ou qualquer combinação dos mesmos, foram eliminados e/ou retirados. É também

possível combinar uma ou várias de tais partes ou
5 fragmentos para fornecer um Nanobody da invenção.

Segundo uma modalidade de execução preferencial, um fragmento conforme usado na presente compreende pelo menos um dos CDR's presentes em um Nanobody de tamanho natural da invenção, preferivelmente pelo menos dois dos CDR's
10 presentes em um Nanobody de tamanho natural da invenção, mais preferivelmente pelo menos CDR2 e CDR3 presentes em um Nanobody de tamanho natural da invenção, tais como, por exemplo, o três CDR's presentes em um Nanobody de tamanho natural da invenção.

Segundo outra modalidade de execução em particular preferida, mas não-restritiva, tal parte ou fragmento compreendem pelo menos FR3, CDR3 e FR4 do correspondente Nanobody de comprimento completo da invenção, isto é, como, por exemplo, descrito na solicitação internacional WO
15 03/050531 (Lasters et al.).

Preferivelmente, tais partes ou fragmentos devem ser tais que eles ainda podem ligar a, ter afinidade para e/ou ter especificidade para vWF, isto é, com uma afinidade e/ou uma especificidade que é pelo menos 10%, preferivelmente
25 pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mesmo mais preferivelmente pelo menos 80%, como pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99% ou mais, da afinidade e/ou a

especificidade do Nanobody de tamanho natural correspondente da invenção, por exemplo, um ensaio para determinar a ligação do análogo a vWF, e em particular um dos ensaios conforme usados nos Exemplos apresentados posteriormente.

5 Da descrição mais acima, ficará claro que as seqüências aminoácidas dos nanocorpos usados na presente se diferenciam em pelo menos uma posição aminoácida em pelo menos uma das regiões de armação das seqüências aminoácidas de domínios VH que ocorrem naturalmente, como as seqüências aminoácidas de domínios VH que ocorrem naturalmente de anticorpos de seres humanos. Especialmente, ficará claro que as seqüências aminoácidas dos nanocorpos usados na presente se diferenciam em pelo menos um dos Resíduos de Hallmark de seqüências aminoácidas de domínios VH que ocorrem naturalmente, como as seqüências aminoácidas de domínios VH que ocorrem naturalmente de anticorpos de Camelídeos e/ou seres humanos.

Portanto, segundo uma modalidade de execução específica, um Nanobody da invenção tem uma seqüência aminoácida que se diferencia em pelo menos uma posição aminoácida em uma das regiões de armação da seqüência aminoácida de um domínio VH que ocorre naturalmente. Segundo uma modalidade de execução mais específica, mas não-restritiva da invenção, um Nanobody da invenção tem uma seqüência aminoácida que se diferencia em pelo menos um dos resíduos de Hallmark da seqüência aminoácida de um domínio VH que ocorre naturalmente.

Da descrição mais acima, também ficará claro que as seqüências aminoácidas de alguns nanocorpos da invenção, como os nanocorpos humanizados da invenção, se diferenciarão em pelo menos uma posição aminoácida em pelo menos uma das regiões de armação (isto é, na posição de um resíduo de Hallmark ou em outra posição) das seqüências aminoácidas de domínios VHH que ocorrem naturalmente. Portanto, segundo uma modalidade de execução específica, mas não-restritiva, um Nanobody da invenção tem uma seqüência aminoácida que se diferencia em pelo menos uma posição aminoácida em uma das regiões de armação da seqüência aminoácida de um domínio VHH de ocorrência natural. Segundo uma modalidade de execução mais específica, mas não-restritiva da invenção, um Nanobody da invenção tem uma seqüência aminoácida que se diferencia em pelo menos um dos resíduos de Hallmark da seqüência aminoácida de um domínio VHH de ocorrência natural.

Conforme acima mencionado, a invenção também se refere a proteína ou polipeptídios que compreendem pelo menos um domínio VHH (isto é, como identificado utilização dos métodos da invenção) ou pelo menos um Nanobody baseado nisso.

Segundo uma modalidade de execução não-restritiva da invenção, tal polipeptídio da invenção essencialmente compõe-se de um Nanobody. "Por essencialmente compõem-se de quer dizer que a seqüência aminoácida do polipeptídio da invenção qualquer é exatamente o mesmo como a seqüência aminoácida de um Nanobody (como acima mencionado) ou

corresponde à seqüência aminoácida de um Nanobody no qual um número limitado de resíduos aminoácidos, como 1-10 resíduos aminoácidos e preferivelmente 1-6 resíduos aminoácidos, como 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 resíduos aminoácidos, foram acrescentados ao fim terminal amino, ao fim terminal carboxi, ou tanto ao fim terminal amino como ao fim terminal carboxi da seqüência aminoácida do Nanobody.

Ditos resíduos aminoácidos podem ou não modificar-se, alterar-se ou de outra maneira influir nas propriedades (biológicas) do Nanobody e podem ou não acrescentar a nova funcionalidade ao Nanobody. Por exemplo, ditos resíduos aminoácidos pode:

a) formar "uma etiqueta", isto é, uma seqüência aminoácida ou o resíduo que permite ou facilita a purificação do Nanobody, por exemplo, usando técnicas de afinidade dirigidas contra dita seqüência ou resíduo. Depois disso, a dita seqüência ou o resíduo podem ser retirados (p. ex. por produto químico ou rachadura enzimáticas) para fornecer a seqüência de nucleotídeos da invenção (com esta finalidade, a seqüência ou o resíduo podem ser opcionalmente ligados à seqüência aminoácida da invenção via uma seqüência de linker separável). Alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos de tais resíduos são múltiplos resíduos histidina e resíduos glutatione,

b) pode ser um Resíduo N-terminal Met, por exemplo, como o resultado da expressão em uma célula hospedeira heteróloga ou organismo hospedeiro.

c) pode ser um ou vários resíduos aminoácidos que podem ser munidos de grupos funcionais e/ou foi funcionalizados, em uma maneira conhecida por si. Por exemplo, como é conhecido na técnica, resíduos aminoácidos como lisina e em determinado cisteína levam em conta o anexo de grupos de PEG, que podem mascarar o sítio superficial em uma proteína e portanto, por exemplo, reduzir imunogenicidade, melhorar a meia-vida no plasma e estabilizar-se contra a rachadura proteolítica;

10 d) aumentar a meia-vida no soro de um Nanobody ou o polipeptídio da invenção. As seqüências de aminoácido que podem ser ligadas a e/ou fundidas com a proteína terapêutica para aumentar a sua meia-vida in vivo são bem sabem à pessoa experimentada e incluem proteína de soro humana ou 15 fragmentos disso (como albumina de soro humana ou uma parte ou fragmento disso), ou até as porções de Fe dos anticorpos (especialmente de anticorpos humanos). Também, como já descrito na presente, uma tal seqüência aminoácida que para aumenta a meia-vida pode ser uma seqüência aminoácida 20 dirigida contra uma proteína de soro, como um Nanobody dirigido contra uma proteína de soro, por exemplo, contra uma albumina de soro humano.

Quanto a pegilação, deve ser observado que geralmente, a invenção também abrange qualquer Nanobody da invenção e/ou 25 o polipeptídio da invenção que foi pegilado em uma ou várias posições aminoácidas, preferivelmente de tal modo que qualquer pegilação preferida (1) aumenta a meia-vida in

vivo; (2) reduz imunogenicidade; (3) fornece uma ou várias novas propriedades benéficas conhecidas por si para pegilação; (4) não afeta essencialmente a afinidade do Nanobody e/ou polipeptídeo para vWF (p. ex. não reduz a referida afinidade em mais de 90%, preferivelmente não em mais de 50%, e mais preferivelmente não em mais de 10%, como determinado por um ensaio conveniente, como os descritos nos Exemplos mais adiante); e/ou (4) não afeta nenhuma das outras propriedades desejadas dos nanocorpos e/ou polipeptídios da invenção. Os GRUPOS PEG convenientes e os métodos que para os ligam, especificamente ou não-especificamente, serão claros para a pessoa experimentada. Os conjuntos convenientes e os reagentes para tal pegilação, por exemplo, podem ser obtidos de Nektar (CA, os EUA).

Segundo uma modalidade de execução não-restritiva, um ou vários resíduos aminoácidos podem ser acrescentados a, inseridos em e/ou substituídos na seqüência aminoácida de um Nanobody ou o polipeptídeo da invenção, para fornecer um ou vários resíduos aminoácidos específicos para ligação de um grupo PEG.

A invenção também abrange qualquer Nanobody da invenção e/ou o polipeptídeo da invenção que foi glicosilado em uma ou várias posições aminoácidas, normalmente dependendo do hospedeira usado para expressar o Nanobody ou o polipeptídeo da invenção (conforme adicionalmente descrito mais adiante).

Segundo uma modalidade de execução não-restritiva, um

ou vários resíduos aminoácidos podem ser acrescentados a, inseridos em e/ou substituídos na seqüência aminoácida de um Nanobody ou o polipeptídio da invenção, para fornecer um ou vários resíduos aminoácidos específicos e/ou um sítio que
5 pode ser glicosilado pelo organismo hospedeiro usado. Por meio de um exemplo preferencial, mas não-restritivo, o N-resíduo na posição 50 dentro de CDR2 de um Nanobody da invenção, por exemplo, pode ser substituído por um Resíduo Q, D ou S para fornecer um sítio de glicosilação, p. ex.
10 para glicosilação por Pichia.

Segundo outra modalidade de execução, um polipeptídio da invenção pode compreender a seqüência aminoácida de um Nanobody, que é fundido na sua extremidade terminal amino, na sua extremidade terminal carboxi, ou tanto na sua
15 extremidade terminal amino como na sua extremidade terminal carboxi com pelo menos uma nova seqüência aminoácida.

Novamente, ditas seqüências aminoácidas adicionais podem ou não modificar-se, alterar-se ou de outra maneira influir nas propriedades (biológicas) do Nanobody e podem ou
20 não acrescentar a nova funcionalidade ao Nanobody.

Por exemplo, segundo uma modalidade de execução preferencial, mas não-restritiva, as referidas seqüências aminoácidas adicionais compreendem pelo menos um novo Nanobody, para fornecer um polipeptídio da invenção que
25 compreende pelo menos dois, como três, quatro ou cinco, nanocorpos, nos quais os referidos nanocorpos podem ser opcionalmente ligados via uma ou várias seqüências de

linkers (conforme definido na presente).

Os polipeptídios da invenção que compreendem dois ou mais nanocorpos fazem também mencionado na presente como "multivalente" polipeptídios., por exemplo, um polipeptídio
5 "bivalente" da Invenção compreende dois nanocorpos, -
opcionalmente ligado via uma seqüência de linker, ao passo que um polipeptídio "trivalente" da invenção compreende três nanocorpos, opcionalmente ligados via duas seqüências de linkers; etc.

10 Em um polipeptídio multivalente da invenção, dois ou mais nanocorpos podem ser os mesmos ou diferentes. Por exemplo, dois ou mais nanocorpos em um polipeptídio multivalente da invenção:

pode ser dirigido contra o mesmo antígeno, isto é,
15 contra as mesmas partes ou epitopes do referido antígeno ou contra duas ou mais partes diferentes ou epitopes do referido antígeno; e/ou: pode ser dirigido contra os antígenos diferentes;

ou uma combinação disso.

20 Portanto, um polipeptídio bivalente da invenção por exemplo:

pode compreender dois nanocorpos idênticos;

pode compreender um primeiro Nanobody dirigido contra uma primeira parte ou epitope de um antígeno e um segundo
25 Nanobody dirigido contra a mesma parte ou epitope do referido antígeno ou contra outra parte ou epitope do referido antígeno;

ou pode compreender um primeiro Nanobody dirigido contra um primeiro antígeno e um segundo Nanobody dirigido contra um segundo antígeno diferente do primeiro referido antígeno; ao passo que um Polipeptídio trivalente da
5 Invenção por exemplo:

- pode compreender três nanocorpos idênticos ou diferentes dirigidos contra as mesmas partes ou diferentes ou epitopes do mesmo antígeno;

- pode compreender dois nanocorpos idênticos ou
10 diferentes dirigidos contra as mesmas partes ou diferentes ou epitopes em um primeiro antígeno e um terceiro Nanobody dirigido contra um segundo antígeno diferente do primeiro referido antígeno; ou

- pode compreender um primeiro Nanobody dirigido
15 contra um primeiro antígeno, um segundo Nanobody

dirigido contra um segundo antígeno diferente do primeiro referido antígeno, e um terceiro Nanobody dirigido contra um terceiro antígeno diferente do primeiro e segundo referido antígeno, os Polipeptídios da invenção que contêm
20 pelo menos dois nanocorpos, nos quais pelo menos um Nanobody é dirigido contra um primeiro antígeno e pelo menos um Nanobody é dirigido contra um segundo Nanobody diferente do primeiro antígeno, também se mencionará como nanocorpos "multiespecífico". Portanto, um "biespecífico" Nanobody é um
25 Nanobody que compreende pelo menos um Nanobody dirigido contra um primeiro antígeno e pelo menos um novo Nanobody dirigido contra um segundo antígeno, ao passo que um

"triespecífico" Nanobody é um Nanobody que compreende pelo menos um Nanobody dirigido contra um primeiro antígeno, pelo menos um novo Nanobody dirigido contra um segundo antígeno, e pelo menos um novo Nanobody dirigido contra um terceiro antígeno; etc.

Conseqüentemente, na sua forma mais simples, um polipeptídio biespecífico da invenção é um polipeptídio bivalente da invenção (conforme definido na presente), compreendendo um primeiro Nanobody dirigido contra um primeiro antígeno e um segundo Nanobody dirigido contra um segundo antígeno, no qual os referidos primeiro e segundo Nanobody podem ser opcionalmente ligados via uma seqüência de linker (conforme definido na presente); ao passo que um polipeptídio triespecífico da invenção na sua forma mais simples é um polipeptídio trivalente da invenção (conforme definido na presente), compreendendo um primeiro Nanobody dirigido contra um primeiro antígeno, um segundo Nanobody dirigido contra um segundo antígeno e um terceiro Nanobody dirigido contra um terceiro antígeno, no qual os referidos primeiro, segundo e terceiro Nanobody pode ser opcionalmente ligado via uma ou mais, e em particular uma, e mais em particular, duas seqüências de linkers.

Contudo, como ficará claro da descrição mais acima, a invenção não é limitada a isso, no sentido de que um polipeptídio multiespecífico da invenção pode compreender qualquer número de nanocorpos dirigidos contra dois ou mais antígenos diferentes.

Para polipeptídios multivalentes e multiespecíficos que contêm um ou vários domínios VHH e a sua preparação, a referência também é feita a Conrath et al., J. Biol. Chem., volume 276, 10. 7346-7350, bem como a EP 0 822985.

5 Os Linkers para uso em polipeptídios multivalentes e multiespecíficos serão claros para a pessoa experimentada, e, por exemplo, incluirão gly-ser linkers, por exemplo, do tipo (glyxsery) Z, como (por exemplo, (gly4ser) 3 ou (gly3ser2) 3i como descrito em WO 99/42077, regiões pregadas
10 como as regiões pregadas de anticorpos de cadeias pesadas que ocorrem naturalmente ou seqüências semelhantes. Para outros linkers convenientes, a referência também é feita à fundamentos técnicos gerais citada anteriormente. Alguns em particular preferiram que linkers sejam dados em SEQ ID NO's
15 83 para 85, no qual os linkers de SEQ ID NO's 84 e 85 são em particular preferidos.

Linkers também podem fornecer um pouco de funcionalidade para o polipeptídio multivalente ou multiespecífico. Por exemplo, linkers contendo um ou vários
20 resíduos aminoácidos carregados (ver a Tabela 1 anteriormente) pode prover propriedades hidrofílicas melhoradas, ao passo que linkers que formam ou contêm pequenos epitopes ou etiquetas podem ser usados para os objetivos de detecção, identificação e/ou purificação.

25 Como também além disso descrito na presente, um polipeptídio multiespecífico da invenção dirigida contra um antígeno desejado e contra pelo menos uma proteína de soro,

como a proteína de soro mencionada a seguir, e especialmente contra uma albumina de soro humano, pode mostrar a meia-vida aumentada no soro, em comparação com o correspondente Nanobody monovalente.

5 Como mencionado mais acima, os métodos descritos na presente são em particular ajustados para gerando tais polipeptídios multiespecíficos multivalentes da invenção.

 Em um polipeptídio da invenção, pelo menos um Nanobody também pode ser ligado a um domínio VH convencional ou a um
10 análogo natural ou sintético de um domínio VH, opcionalmente via uma seqüência de linker.

 Em um polipeptídio da invenção, pelo menos um Nanobody também pode ser ligado a um domínio VL ou a um análogo natural ou sintético de um VL domínio, opcionalmente via uma
15 seqüência de linker, para fornecer um polipeptídio da invenção que está na forma análoga a um fragmento scFv convencional, mas conter um Nanobody em vez de um domínio VH.

 Em um polipeptídio da invenção, pelo menos um Nanobody
20 também pode ser ligado a um ou vários de um CHI, CH2 e/ou domínio CH3, opcionalmente via uma seqüência de linker. Por exemplo, um Nanobody ligado a um domínio CH1 conveniente, por exemplo, pode ser usado - em conjunto com conveniente

 as cadeias leves - para gerar fragmentos/estruturas de
25 anticorpo análogos a fragmentos Fab convencionais ou F (ab')
2 fragmentos, mas no qual ou (em caso de um F (ab') 2
fragmento) um ou ambos dos domínios VH convencionais foi

substituído por um Nanobody. Tais fragmentos também podem ser heteroespecíficos ou biespecífico, isto é, dirigido contra dois ou mais antígenos. Um Nanobody ligado a CH2 conveniente e domínios CH3, por exemplo, derivou de Camelídeos, pode ser usado para formar um anticorpo de cadeia pesada monoespecífico ou biespecífico. Finalmente, um Nanobody ligado a CHI conveniente, CH2 e domínios CH3, por exemplo, derivada de um ser humano, pode ser usado - em conjunto com cadeias leves convenientes - para formar um anticorpo que é análogo a um anticorpo de 4 cadeias convencional, mas no qual ou ambos dos domínios VH convencionais foram substituídos por um Nanobody.

Também, além de um ou vários nanocorpos, os Polipeptídios da Invenção também podem conter grupos funcionais, metades ou resíduos, por exemplo, substâncias terapeuticamente ativas, como os mencionados mais adiante, e/ou marcadores ou etiquetas, como marcadores fluorescentes, isótopos, etc., conforme adicionalmente descrito a seguir.

nanocorpos da invenção, os polipeptídios da invenção, e ácidos nucleicos que codificam o mesmo, pode estar preparado em uma maneira conhecida por si, ou estará claro para a pessoa experimentada da nova descrição na presente. Alguns os métodos preferidos, mas não-restritivos que para preparam nanocorpos, polipeptídios e ácidos nucleicos incluem os métodos e técnicas acima mencionadas e/ou novas descreveram a seguir.

Como estará claro para a pessoa experimentada, um

método especialmente útil para preparar um Nanobody e/ou um polipeptídeo da invenção geralmente compreende os passos de :

5 - a expressão, em uma célula hospedeira conveniente ou organismo hospedeiro (também mencionada na presente como "um hospedeiro da invenção") ou em outro sistema de expressão conveniente de um ácido nucléico que codifica os referidos Nanobody ou o polipeptídeo da invenção (também mencionada na presente como "um ácido nucléico da invenção"),
10 opcionalmente seguido por :

- isolamento e/ou purificação do Nanobody ou polipeptídeo da invenção portanto obtido.

Especialmente, tal método pode compreender os passos de

15 - a cultura e/ou a manutenção de um hospedeiro da invenção em condições que são tais que a referida hospedeira da invenção expressa e/ou produz pelo menos um Nanobody e/ou o polipeptídeo da invenção; opcionalmente seguido por :

20 - isolamento e/ou purificação do Nanobody ou polipeptídeo da invenção portanto obtido.

Um ácido nucléico da invenção pode ser na forma de ADN ou ARN de trançado simples ou duplo, e é preferivelmente na forma do ADN de trançado duplo. Por exemplo, as seqüências de nucleotídeos da invenção podem ser ADN genômico, cDNA ou
25 o ADN sintético (como ADN com um uso de codon que foi especificamente adaptado para expressão na célula hospedeira desejada ou organismo hospedeiro).

Segundo uma modalidade de execução da invenção, o ácido nucléico da invenção está em essencialmente isolado de, conforme definido acima.

O ácido nucléico da invenção também pode ser na forma de, estar presente em e/ou ser parte de um vetor, como, por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo ou YAC, que novamente pode estar na forma essencialmente isolada.

Os ácidos nucléicos da invenção podem estar preparados ou obtidos em uma maneira conhecida por si, baseado na informação nas seqüências aminoácidas para os polipeptídios da invenção dada na presente, e/ou ser isolados de uma fonte natural conveniente. Para fornecer análogos, seqüências de nucleotídeos que codificam domínios de VHH que ocorrem naturalmente, por exemplo, podem ser submetidos a mutagenese direcionada a local, de modo a fornecer um ácido nucléico da invenção que codifica os referidos análogos. Também, como estará claro para a pessoa experimentada, preparar um ácido nucléico da invenção, também várias seqüências de nucleotídeos, como pelo menos uma seqüência de nucleotídeos que codifica Nanobody e ácidos, por exemplo, nucléicos que codificam um ou vários linkers podem ser ligadas em conjunto em uma maneira conveniente.

As técnicas para gerar os ácidos nucléicos da invenção serão claras à pessoa experimentada e podem incluir por exemplo, mas não são limitadas a, síntese de ADN automatizada; mutagenese direcionada a local; a combinação de duas ou mais seqüências que ocorrem naturalmente e/ou

sintéticas (ou dois ou mais partes das mesmas), a introdução de mutações que levam à expressão de um produto de expressão truncado; a introdução de um ou vários sítios de restrição (p. ex. para criar cassetes e/ou regiões que podem ser facilmente digeridas e/ou ligadas utilizando enzimas de restrição convenientes), e/ou a introdução de mutações por meio de uma reação PCR que usa um ou vários escorvadores "mal combinados", usando, por exemplo, uma seqüência de uma GPCR de ocorrência natural como um padrão. Estas e outras técnicas serão claras à pessoa experimentada, e a referência é novamente feita aos manuais padrão, como Sambrook. e Ausubel et al., acima mencionado, bem como os Exemplos mais adiante.

O ácido nucléico da invenção também pode ser na forma de, estar presente em e/ou ser parte de um construto genético, como estará claro para a pessoa experimentada na técnica. Tais construtos genéticos geralmente compreendem pelo menos um ácido nucléico da invenção que é opcionalmente ligada a um ou vários elementos de construto genético conhecido por si, como, por exemplo, um ou vários elementos reguladores convenientes (como um promotor(es) conveniente, realçador(es), exterminador(es), etc.) e os novos elementos dos construtos genéticos mencionados a seguir. Tais construtos genéticos compreendendo pelo menos um ácido nucléico da invenção também serão referidos na presente como "construto genético da invenção".

O construto genético da invenção pode ser ADN ou o

ARN, e são o ADN preferivelmente de trançado duplo. O construto genético da invenção também pode estar em uma forma conveniente para a transformação da célula hospedeira desejada ou organismo hospedeiro, em uma forma conveniente para integração no ADN genômico da célula hospedeira desejada ou em uma forma de réplica independente conveniente, manutenção e/ou herança no organismo hospedeiro desejado. Por exemplo, o construto genético da invenção pode ser na forma de um vetor, como, por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo, YAC, um vetor viral ou transposon. Especialmente, o vetor pode ser um vetor de expressão, isto é, um vetor que pode prover a expressão in vitro e/ou in vivo (p. ex. em uma célula hospedeira conveniente, organismo hospedeiro e/ou sistema de expressão).

Em uma modalidade de execução preferencial mas não-restritiva, um construto genético da invenção compreende

- a) pelo menos um ácido nucléico da invenção; operavelmente conectado a
- b) um ou vários elementos reguladores, como um promotor e opcionalmente um exterminadores conveniente;
- c) e opcionalmente também
- d) um ou vários novos elementos dos construtos genéticos conhecido por si;

no qual os termos "elemento regulador", "o promotor", "exterminadores" e "operavelmente conectado" tem a sua significação habitual na técnica (conforme adicionalmente descrito mais adiante); e no qual os referidos "novos

elementos" o presente no construto genético, por exemplo, pode ser 3'-ou 5 seqüências '-UTR, seqüências de líder, marcadores de seleção, genes de marcadores/repórter de expressão, e/ou elementos que podem facilitar ou aumentar (a
5 eficiência de) a transformação ou a integração. Estes e outros elementos convenientes para tal construto genético ficará claro para a pessoa experimentada, e pode depender, por exemplo, do tipo de construto usado, a célula hospedeira desejada ou organismo hospedeiro; a maneira na qual as
10 seqüências de nucleotídeos da invenção do interesse devem ser expressas (p. ex. via a expressão constitutiva, transiente ou induzível); e/ou a técnica de transformação a ser usada.

Preferivelmente, no construto genético da invenção, os
15 referidos pelo menos um ácido nucléico da invenção e os referidos elementos reguladores, e opcionalmente os referidos um ou vários novos elementos, são "operavelmente ligados" um a outro, pelo qual geralmente quer dizer que eles estão em uma relação funcional um com outro. Por
20 exemplo, um promotor é considerado "operavelmente ligado" a uma seqüência de codificação se o referido promotor for capaz de iniciar ou controlar/regular de outra maneira a transcrição e/ou a expressão de uma seqüência de codificação (no qual os referidos codificação de seqüência

25 deve ser entendido como sendo "no controle de ' os referidos promotor). Geralmente, quando duas seqüências de nucleotídeos são operavelmente ligado, eles estarão na mesma

orientação e normalmente também na mesma armação de leitura. Eles também serão normalmente essencialmente contíguos, embora isto também não possa ser requerido.

Preferivelmente, os elementos reguladores e novos dos construtos genéticos da invenção são tais que eles são capazes de fornecer a sua função biológica desejada na célula hospedeira desejada ou organismo hospedeiro.

Por exemplo, um promotor, realçador ou exterminadores deve ser "operável" na célula hospedeira desejada ou organismo hospedeiro, pelo qual se quer dizer que (por exemplo) o referido promotor deve ser capaz da iniciação ou de outra maneira controlar/regular a transcrição e/ou a expressão de uma seqüência de nucleotídeos - p. ex. uma seqüência de codificação - ao qual ele está operavelmente ligado (conforme definido na presente).

Alguns promotores em particular preferenciais incluem, mas não são limitados a, promotores conhecidos por si para a expressão em células bacterianas, como as mencionadas a seguir e/ou os usados nos Exemplos.

Um marcador de seleção deve ser tal que permita - isto é, em condições de seleção apropriadas - células hospedeiras e/ou organismos hospedeiros que foram (com sucesso) transformadas com a seqüência de nucleotídeos da invenção a ser distinguida de células/organismos hospedeiros que não foram (com sucesso) transformados. Alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos de tais marcadores são genes que fornecem a resistência contra antibióticos (como

canamicina ou ampicilina), genes que provêm resistência à temperatura, ou genes que permitem a célula hospedeira ou organismo hospedeiro a serem mantidos na ausência de certos fatores, compostos e/ou componentes (alimentares) no meio que são essenciais para a sobrevivência das células não-transformadas ou organismos.

Uma seqüência líder deve ser tal que - na célula hospedeira desejada ou organismo hospedeiro - ela leva em conta as modificações pós-translação desejadas e/ou tal que ela dirige o mRNA transcrito a uma parte desejada ou organela de uma célula. Uma seqüência líder também pode levar em conta a secreção do produto de expressão da referida célula. Como tal, a seqüência líder pode ser alguma pro-, pre-, ou a prepro-seqüência operável na célula hospedeira ou organismo hospedeiro. As seqüências de líder não podem ser requeridas para expressão em uma célula bacteriana.

Um marcador de expressão ou o gene de repórter devem ser tais que - na célula hospedeira ou organismo hospedeiro - ele leva em conta a detecção da expressão (de um gene ou seqüência de nucleotídeos presente em) os construtos genéticos. Um marcador de expressão também pode levar em conta opcionalmente a localização do produto expresso, p. ex. em uma parte específica ou organela de uma célula e/ou em célula(s) específica (a), tecido(s), órgão (es) ou parte(s) de um organismo multicelular. Tais genes de repórter também podem ser expressos como uma fusão de

proteína com a seqüência aminoácida da invenção. Alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos incluem a proteína fluorescente como GFP.

Alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos dos promotores convenientes, exterminadores e novos elementos incluem os usados nos Exemplos mais adiante. Para alguns (novos) exemplos não-restritivos dos promotores, marcadores de seleção, seqüências de líder, marcadores de expressão e novos elementos que podem ser apresentados/usados no construto genético da invenção - como exterminadores, realçadores transcrpcionais e/ou de translação e/ou fatores de integração - é feita referência aos manuais gerais como Sambrook. e Ausubel acima mencionados, bem como aos exemplos que são dados em WO 95/07463, WO 96/23810, WO 95/07463, WO 95/21191, WO 97/11094, WO 97/42320, WO 98/06737, WO 98/21355, os US-A-6,207,410, US - - 5,693,492 e EP 1085089. Outros exemplos serão claros para a pessoa experimentada. A referência também é feita à fundamentos técnicos gerais citados anteriormente e as novas referências citadas a seguir.

O construto genético da invenção pode ser geralmente fornecido por apropriadamente ligando a seqüência(s) nucleotídeos da invenção a um ou vários novos elementos descritos anteriormente, por exemplo, usando as técnicas descritas nos manuais gerais como Sambrook. e Ausubel et al., acima mencionado.

Freqüentemente, o construto genético da invenção será

obtido inserindo uma seqüência de nucleotídeos da invenção em um vetor conveniente (expressão) conhecido por si. Alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos dos vetores de expressão convenientes são os usados nos Exemplos mais
5 adiante, bem como os mencionados mais adiante.

Os ácidos nucléicos da invenção e/ou o construto genético da invenção pode

seja usado para transformar uma célula hospedeira ou o organismo hospedeiro, isto é, para expressão e/ou produção
10 de o

Nanobody ou polipeptídeo da invenção. Os anfitriões convenientes ou as células hospedeiras serão claros para a pessoa experimentada, e, por exemplo, podem ser convenientes fungoso, procariótica ou a célula eucariótica ou

15 linha de célula ou algum conveniente fungoso, procariótica ou organismo eucariótico, por exemplo:

- uma classe bacteriana, inclusive, mas não limitado a, classes negativas de grama como classes de *Escherichia coli*; de *Proteus*, por exemplo, de *Proteus mirabilis*; de
20 *Pseudomonas*, por exemplo, de *Pseudomonas fluorescens*; e classes positivas de grama como classes de *Bacillus*, por exemplo, de *Bacillus subtilis* ou de *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por exemplo, de *Streptomyces lividans*; de *Estafilococo*, por exemplo, de *Estafilococo carnosus*; e de
25 *Lactococcus*, por exemplo, de *Lactococcus lactis*;

- uma célula fungosa, inclusive, mas não limitado a, células de espécie de *Trichoderma*, por exemplo, de

Trichoderma reesei; de Neurospora, por exemplo, de Neurospora crassa; de Sordaria, por exemplo, de Sordaria macrospora; de Aspergillus, por exemplo, do Níger Aspergillus ou de Aspergillus sojae; ou de outros fungos
5 filamentosos;

uma célula de levedura, inclusive, mas não limitado a, células de espécie de Saccharomyces, por exemplo, de Saccharomyces cerevisiae; de Schizosaccharomyces, por exemplo, de Schizosaccharomyces pombe; de Pichia, por exemplo, de Pichia pastoris ou de Pichia methanolica; de
10 Hansenula, por exemplo, de Hansenula polymorpha; de Kluyveromyces, por exemplo, de Kluyveromyces lactis; de Arxula, por exemplo, de Arxula adenivorans; de Yarrowia, por exemplo, de Yarrowia lipolytica;

15 uma linha de célula ou célula anfíbia, como Xenopus oocytes;

uma linha de célula ou célula derivada por inseto, como linhas de células/célula derivadas de lepidoptera, inclusive mas não limitado a Spodoptera SF9 e células Sf21
20 ou as linhas de células/célula derivadas de Drosophila, como Schneider e células Kc;

uma planta ou célula de planta, por exemplo, em plantas de fumo; e/ou

uma linha de célula ou célula de mamífero, por exemplo, derivada de uma linha de célula ou célula derivada
25 de um ser humano, de mamíferos inclusive mas não limitado a CHO-células, BHK-células (por exemplo, células de BHK-21) e

células humanas ou linhas de célula como HeLa, COS (por exemplo, COS 7) e PER C6 células;

bem como todos outros anfitriões ou células hospedeiras conhecidas por si para a expressão e a produção
5 de anticorpos e fragmentos de anticorpo (inclusive, mas não limitado a, anticorpos de domínio (únicos) e fragmentos ScFv), o que ficará claro para a pessoa experimentada. A referência também é feita à fundamentos técnicos gerais citados mais acima, bem como a, por exemplo, WO 94/29457; WO
10 96/34103; WO 99/42077; Frenken et al., (1998), supra; Riechmann e Muyldermans, (1999), supra; perua der Tília, (2000), supra; Thomassen et al., (2002), supra; Joosten et al., (2003), supra; Joosten et al., (2005), supra; e as novas referências citadas na presente.

15 nanocorpos e os polipeptídios da invenção também podem ser apresentados e expressos em uma ou várias células, tecidos ou órgãos de um organismo multicelular, por exemplo, para objetivos profiláticos e/ou terapêuticos (p. ex. como uma terapia genética). Com esta finalidade, as seqüências de
20 nucleotídeos da invenção podem ser introduzidas nas células ou tecidos de qualquer modo conveniente, por exemplo, como tal (p. ex. utilização de lipossomas) ou depois que eles foram inseridos em um vetor de terapia genético conveniente (por exemplo, derivados de retroviruses como adenovirus, ou
25 parvoviruses como vírus adeno-associado). Como também ficará claro para a pessoa experimentada, tal terapia genética pode ser executada in vivo e/ou em situ no corpo de um paciente

administrando um ácido nucléico da invenção ou um vetor de
terapia genético conveniente codificando o mesmo ao paciente
ou a células específicas ou um tecido específico ou órgão do
paciente; ou as células convenientes (freqüentemente tomado
5 do corpo do paciente a ser tratado, como linfócitos
explantados, aspirados do tutano dos ossos ou biópsias de
tecido) podem ser tratadas in vitro com uma seqüência de
nucleotídeos da invenção e logo ser apropriadamente (re)
introduzidas no corpo do paciente. Tudo isso pode ser
10 executado usando vetores de terapia genéticos, técnicas e
sistemas de entrega que são bem conhecidos à pessoa
experimentada, para Culver, K. W., "Terapia Genética", 1994,
p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, Nova York, N.Y.).
Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper,
15 Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Ciência 256 (1992),
808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lanceta 348
(1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-
1086; Onodera, Sangue 91; (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5
(1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Jogo.: 811 (1997),
20 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51;
Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO
97/00957, US 5,580,859; os 1 US 5,589,546; ou Schaper,
Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 63 5-640. Por
exemplo, expressão in situ de fragmentos ScFv (Afanasieva et
25 al., Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) e de diabodies
(Blanco et al., J. O Immunol, 171, 1070-1077 (2003)) foi
descrito na técnica.

Para a expressão dos nanocorpos em uma célula, eles também podem ser expressos como assim chamados ou como os assim chamados "intracorpos", como, por exemplo, descrito em WO 94/02610, WO 95/22618 e USA 7004940; WO 03/014960; em
5 Cattaneo, A. e Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes e Springer-Verlag; e em Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.

Para a produção, os nanocorpos e os polipeptídios da invenção, por exemplo, também podem ser produzidos no leite
10 de mamíferos transgênicos, por exemplo, no leite de coelhos, vacas, cabras ou ovelhas (ver, por exemplo, os US-A-6,741,957, os US-A-6,304,489 e US-A-6,849,992 para técnicas gerais para introduzir transgenes em mamíferos), em plantas ou partes de plantas inclusive mas não limitado às suas
15 folhas, flores, frutos, semente, raízes ou tubérculos (por exemplo, em fumo, milho, feijão-soja ou alfafa) ou em, por exemplo, pupas do bicho da seda *Bombix mori*.

Além disso, os nanocorpos e os polipeptídios da invenção também podem ser expressos e/ou produzidos em
20 sistemas de expressão sem célula, e os exemplos convenientes de tais sistemas serão claros para a pessoa experimentada. Alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos incluem a expressão no sistema de germe de trigo; em reticulocyte lysates em coelhos; ou no *E. coli* Zubay sistema.

25 Conforme acima mencionado, uma das vantagens do uso de nanocorpos é que os polipeptídios baseados neles podem estar preparados através de expressão em um sistema bacteriano

conveniente,

e os sistemas de expressão bacterianos convenientes, os vetores, as células hospedeiras, os elementos reguladores, etc., serão claros para a pessoa experimentada, por exemplo, das referências citadas anteriormente. Deve 5 contudo ser observado que a invenção no seu sentido mais amplo não é limitada à expressão em sistemas bacterianos.

Preferivelmente, na invenção, um (em vivo ou em vitro) sistema de expressão, como um sistema de expressão 10 bacteriano, é usado que fornece os polipeptídios da invenção em uma forma que é conveniente para uso farmacêutico, e tais sistemas de expressão serão novamente claros para a pessoa experimentada. Como também ficará claro para a pessoa experimentada, os Polipeptídios da invenção convenientes 15 para uso farmacêutico podem ser preparados usando técnicas para síntese de peptídeo.

Para produção em escala industrial, anfitriões heterólogos preferidos para a produção (industrial) de nanocorpos ou proteína terapêutica que contém Nanobody 20 inclui classes de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* que são convenientes para expressão/produção/fermentação em grande escala, e especialmente para expressão/produção/fermentação farmacêutica em grande escala. Os exemplos convenientes de tais classes serão 25 claros para a pessoa experimentada. Tais classes e os sistemas de produção/expressão também são postos à disposição por companhias como Biovitrum (Úpsala, Suécia).

Alternativamente, as linhas de célula de mamíferos, em determinadas células dos ovários de hamster chinês (CHO), podem ser usadas para expressão/produção/fermentação em grande escala, e especialmente para
5 expressão/produção/fermentação farmacêutica em grande escala. Novamente, tais sistemas de expressão/produção também são postos à disposição por algumas companhias acima mencionadas.

A escolha do sistema de expressão específico
10 dependeria em parte do requisito para certas modificações pós-translação, mais especificamente glicosilação. A produção de uma proteína recombinante que contenha Nanobody para a qual a glicosilação é desejada ou requerida exigiria o uso de anfitriões de expressão mamíferos que têm a
15 capacidade de glicosilar a proteína expressa. Neste aspecto, estará claro para a pessoa experimentada que o modelo de glicosilação obtido (isto é, a espécie, número e posição de resíduos ligados) dependerá da linha de célula ou célula que é usada para a expressão. Preferivelmente, uma linha de
20 célula ou célula humana é usada (isto é, levar a uma proteína que essencialmente tem um modelo da glicosilação humana) ou outra linha de célula de mamífero é usada que pode fornecer um modelo de glicosilação que é essencialmente e/ou funcionalmente o mesmo como glicosilação humana ou pelo
25 menos imita glicosilação humana. Geralmente, anfitriões procarióticos como E. coli não têm a capacidade de glicosilar proteína, e o uso de eucariotes inferiores como

levedura que normalmente leva a um modelo de glicosilação que se diferencia da glicosilação humana. Sem embargo, deve ser entendido que todas as células hospedeiras precedentes e os sistemas de expressão podem ser usados na invenção, dependendo do Nanobody desejado ou proteína a ser obtida.

Portanto, segundo uma modalidade de execução não-restritiva da invenção, o Nanobody ou o polipeptídeo da invenção é glicosilado. Segundo outra modalidade de execução não-restritiva da invenção, o Nanobody ou o polipeptídeo da invenção é não-glicosilado.

Segundo uma modalidade de execução preferencial, mas não-restritiva da invenção, o Nanobody ou o polipeptídeo da invenção é produzido em uma célula bacteriana, especialmente uma célula bacteriana conveniente para produção farmacêutica em grande escala, como as células das classes acima mencionadas.

Segundo outra modalidade de execução preferida, mas não-restritiva da invenção, o Nanobody ou o polipeptídeo da invenção é produzido em uma célula de levedura, especialmente uma célula de levedura conveniente para produção farmacêutica em grande escala, como as células da espécie acima mencionada.

Segundo ainda outra modalidade de execução preferida, mas não-restritiva da invenção, o Nanobody ou o polipeptídeo da invenção é produzido em uma célula de mamífero, especialmente em uma célula humana ou em uma célula de uma linha de célula humana, e mais especialmente em uma célula

humana ou em uma célula de uma linha de célula humana que é conveniente a para produção farmacêutica em grande escala, como as linhas de célula mencionadas mais acima.

Quando a expressão em uma célula hospedeira é usada
5 para produzir os nanocorpos e a proteína da invenção, os nanocorpos e a proteína da invenção podem ser produzidos intracelularmente (p. ex. no cytosol, no periplasma ou em corpos de inclusão) e logo isolados das células hospedeiras e opcionalmente além disso purificados; ou podem ser
10 produzidos extracelularmente (p. ex. no meio no qual as células hospedeiras são cultivadas) e logo isolados do meio de cultura e opcionalmente além disso purificados. Quando as células hospedeiras eucarióticas são usadas, a produção extracelular é normalmente preferida desde que isto
15 consideravelmente facilita a nova isolação e processamento posterior dos nanocorpos e proteína obtida. As células bacterianas como as classes de E. coli acima mencionadas normalmente não segregam a proteína extracelularmente, exceto algumas classes da proteína como toxinas e
20 hemolisina, e produção secretórios em E. o coli refere-se à deslocamento da proteína através da membrana interior ao espaço periplásmico. A produção de Periplásmico fornece várias vantagens por cima da produção citosólica. Por exemplo, o Nterminal amino a seqüência ácida do produto
25 segregado pode ser idêntico ao produto genético natural depois da rachadura da seqüência de sinal de secreção por um sinal específico peptidase. Também, parece haver muito menos

atividade de protease no periplasma do que no citoplasma. Além do mais, a purificação de proteína é mais simples devido a menos proteína de contaminação no periplasma. Outra vantagem é que as ligações bissulfeto corretas podem formar-se porque o periplasma fornece mais ambiente oxidativo do que o citoplasma. A proteína sobreexpressada em *E. coli* freqüentemente é encontrada em agregados insolúveis, assim chamados corpos de inclusão. Esses corpos de inclusão podem ser localizados no cytosol ou no periplasma; a recuperação da proteína biologicamente ativa desses corpos de inclusão requer um processo de denaturação/repregado. Muita proteína recombinante, inclusive a proteína terapêutica, é recuperada de corpos de inclusão. Alternativamente, como estará claro para a pessoa experimentada, classes recombinantes de bactérias que foram geneticamente modificadas para segregar uma proteína desejada, e especialmente um Nanobody ou um polipeptídio da invenção, pode ser usado.

Portanto, segundo uma modalidade de execução não-restritiva da invenção, o Nanobody ou o polipeptídio da invenção é um Nanobody ou o polipeptídio que foi produzido intracelularmente e foi isolado da célula hospedeira, e especialmente de uma célula bacteriana ou de um corpo de inclusão em uma célula bacteriana. Segundo outra modalidade de execução não-restritiva da invenção, o Nanobody ou o polipeptídio da invenção é um Nanobody ou o polipeptídio que foi produzido extracelularmente, e foi isolado do meio no qual a célula hospedeira é cultivada.

Alguns promotores preferidos, mas não-restritivos para uso com essas células hospedeiras incluem,

- para expressão em *E. coli*: promotor de lac (e derivados disso como o promotor lacUV5); promotor de arabinose; deixado - (PL) e para a direita (PR) promotor de lambda fago; promotor do trp operon; híbrido lac/trp promotores (tac e trc); T7-promotor (mais especificamente que de 10 genéticos T7-fago) e outros promotores T-fago; promotor do Tn 10 gene de resistência tetraciclina; as variantes projetadas dos promotores acima mencionados que incluem uma ou várias cópias de uma seqüência de operador reguladora estranha;

- para expressão em *S. cerevisiae*: constitutivo: ADH1 (álcool desidrogenase 1), ENO (enolase), CYC1 (citocromo c iso-1), GAPDH (gliceraldeidos-3-fosfato desidrogenase); PGK1 (fosfoglicerato quinase), PYK1 (piruvato quinase); regulado: GAL 1,10,7 (galactose enzimas metabólicas), ADH2 (álcool desidrogenase 2), PHO5 (ácido fosfatase), XÍCARA I (cobre metalotioneina); heterólogo: CaMV (promotor de 35 de vírus de mosaico de couve-flor);

- para expressão em *Pichia pastoris*: o promotor AOXI (álcool oxidase I)

- para expressão em células de mamíferos: citomegalovirus humano (hCMV) primeiro realçador/promotor imediato; citomegalovirus humano (hCMV) primeira variante de promotor imediata que contém duas seqüências de operador tetraciclina tal que o promotor pode ser regulado pelo Tet

repressor; Herpes Vírus de Simplex timidina quinase (TK) promotor; Vírus de Sarcoma de Rous repetição terminal longa (RSV LTR) realçador/promotor; fator de alongamento la (hEF-la) promotor de ser humano, chimpanzé, rato ou camundongo; o
 5 SV40 primeiro promotor; HIV-1 promotor de repetição terminal longo; (promotor 3-actin;

Alguns que os vetores preferidos, mas não-restritivos para uso com essas células hospedeiras incluem:

- vetores para expressão em células de mamíferos:
 10 pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMClneo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC37199), pRSVneo (ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) e 1ZD35 (ATCC 37565), bem
 15 como sistemas de expressão virais, como aqueles baseados em adenovirus;

- vetores para expressão em células bacteriais: vetores de estimacão (Novagen) e vetores pQE (Qiagen);

- vetores para expressão em levedura ou outras
 20 células fungosas: pYES2 (Invitrogen) e vetores de expressão Pichia (Invitrogen);

- vetores para expressão em células de inseto: pBlueBacII (Invitrogen) e outros vetores baculovirus

- vetores para expressão em plantas ou células de
 25 planta:, por exemplo, os vetores baseados em vírus de mosaico de couve-flor ou vírus de mosaico de fumo, as classes convenientes do Agrobacterium, ou Vetores baseados

em Ti-plasmídeo.

Algumas seqüências secretoras preferidas, mas não-limitadas para uso com essas células hospedeiras incluem:

- para uso em células bacterianas como E. coli:
5 PelB, Bla, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, StII, PhoA, PhoE, MaIE, Lpp, LamB, e assim por diante; BILRE peptídeo de sinal, hemolisina C sinal de secreção terminal
- para uso em levedura: acasalando prepro-seqüência de fator, fosfatase (pho1), invertase (Suc), etc.;
- 10 - para uso em células de mamíferos: o sinal nativo em caso de que a proteína objetivo seja de origem eucariótica; os murinos Ig de K-cadeia V-J2-C transmitem o peptídeo; etc.

As técnicas convenientes que para transformar uma
15 célula hospedeira ou hospedeiro da invenção serão claras à pessoa experimentada e podem depender do organismo hospedeiro/ célula hospedeira desejado e os construtos genéticos a serem usados. A referência é novamente feita aos manuais e pedidos de patentes acima mencionados.

20 Depois da transformação, um passo para detectar e selecionar aquelas células hospedeiras ou organismos hospedeiros que foram com sucesso transformados com a seqüência de nucleotídeos / construto genético da invenção pode ser executado. Isto pode ser, por exemplo, um passo de
25 seleção baseado em um marcador selecionável presente no construto genético da invenção ou um passo que implica a detecção da seqüência aminoácida da invenção, p. ex. usando

anticorpos específicos.

A célula hospedeira transformada (que pode estar na forma ou uma linha de célula estável) ou organismos hospedeiros (que pode ser na forma de uma linha ou classe mutante estável) formam novos aspectos da presente invenção.

Preferivelmente, essas células hospedeiras ou os organismos hospedeiros são tais que eles expressam, ou são (pelo menos) capazes de expressar (p. ex. em condições convenientes), uma seqüência aminoácida da invenção (e em caso de um organismo hospedeiro: em pelo menos uma célula, parte, tecido ou órgão disso). A invenção também inclui novas gerações, progênie e/ou descendência da célula hospedeira ou o organismo hospedeiro da invenção, que pode ser, por exemplo, obtida pela divisão de célula ou pela reprodução sexual ou assexual.

Produzir/obter a expressão das seqüências aminoácidas da invenção, a célula hospedeira transformada ou o organismo hospedeiro transformado podem ser geralmente guardados, mantidos e/ou cultivados em condições tais que a seqüência aminoácida (desejada) da invenção é expressada/produzida. As condições convenientes serão claras à pessoa experimentada e dependerão normalmente do organismo hospedeiro/ célula hospedeira usado, bem como dos elementos reguladores que controlam a expressão da seqüência de nucleotídeos (relevante) da invenção. Novamente, é feita referência aos manuais e pedidos de patentes acima mencionados nos

parágrafos no construto genético da invenção.

5 Geralmente, as condições convenientes podem incluir o uso de um meio conveniente, a presença de uma fonte conveniente de nutrientes alimentares e/ou convenientes, o uso de uma temperatura conveniente, e opcionalmente a presença de um fator de indução ou composto conveniente (p. ex. quando as seqüências de nucleotídeos da invenção estão sob o controle de um promotor induzível); todos os quais podem ser selecionados pela pessoa experimentada. Novamente,
10 em tais condições, as seqüências aminoácidas da invenção podem ser expressas em uma maneira constitutiva, de uma maneira transiente, ou só quando apropriadamente induzido.

Também estará claro para a pessoa experimentada que a seqüência aminoácida da invenção pode ser (primeiro) gerada
15 em uma forma imatura (como acima mencionado), que então pode ser submetida à modificação pós-translação, dependendo do organismo hospedeiro/ célula hospedeira usado. Também, a seqüência aminoácida da invenção pode ser glicosilada, novamente dependendo do organismo hospedeiro/ célula hospedeira usado.
20

A seqüência aminoácida da invenção então pode ser isolada do organismo hospedeiro/ célula hospedeira e/ou do meio no qual os referidos célula hospedeira ou organismo hospedeiro foram cultivados, usando isolação de proteína
25 e/ou técnicas de purificação conhecidas por si, como cromatografia (preparativo) e/ou técnicas de eletroforese, técnicas de precipitação diferenciais, técnicas de afinidade

(p. ex. usando uma seqüência aminoácida específica, separável fundida com a seqüência aminoácida da invenção) e/ou técnicas imunológicas preparativas (isto é, usando anticorpos contra a seqüência aminoácida a ser isolada).

5 Geralmente, para uso farmacêutico, os polipeptídios da invenção podem ser formulados como uma preparação farmacêutica que compreende pelo menos um polipeptídio da invenção e pelo menos uma transportadora farmacêuticamente aceitável, diluente ou excipiente e/ou adjuvante, e
10 opcionalmente um ou vários polipeptídios novos farmacêuticamente ativos e/ou compostos. Por meio de exemplos não-restritivos, tal formulação pode estar em uma forma conveniente para administração oral, para administração parenteral (como por injeção intravenosa,
15 intramuscular ou subcutânea ou infusão intravenosa), para administração tópica, para administração pela inalação, por um adesivo na pele, por um implante, por um supositório, etc... Tais formas de administração convenientes - que pode ser sólido, semi-sólido ou líquido, dependendo da maneira de
20 administração - bem como métodos e transportadoras para uso na preparação disso, serão claras à pessoa experimentada, e são além disso descritas a seguir.

Portanto, em um novo aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que contém pelo menos um
25 Nanobody da invenção ou pelo menos um polipeptídio da invenção e pelo menos uma transportadora conveniente (isto é, uma transportadora conveniente para uso veterinário), e

opcionalmente uma ou várias novas substâncias ativas.

Uma modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio a compreensão:

5 pelo menos um Nanobody da invenção, isto é, dirigido contra algum de vWF, vWF domínio de A1, domínio de A1 de vWF ativado, vWF A3 domínio.

10 Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito acima, em que o Nanobody da invenção dirigida contra o domínio de A1 de vWF ativado especificamente reconhece a conformação vWF ativada no sítio da formação trombo mas não liga à circulação das formas não ativadas do vWF.

15 O nanocorpos da invenção também pode ser dirigido contra um fragmento de vWF, vWF A1 domínio, o domínio de A1 de vWF ativado, vWF A3 domínio, como um fragmento capaz de eliciar uma resposta imune. Um objetivo é também um fragmento de vWF, vWF domínio de A1, o domínio de A1 de vWF ativado, vWF A3 domínio, capaz da ligação a um Nanobody da invenção levantado contra o objetivo de comprimento completo
20 'de pais'.

Um fragmento conforme usado na presente refere-se a menos de 100% da seqüência (p. ex., 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% etc.), mas compreendendo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,
25 25 ou mais aminoácidos. Um fragmento é do comprimento suficiente tal que a interação do interesse é mantida com a afinidade de $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ x ou melhor.

Um fragmento conforme usado na presente também se refere a inserções opcionais, as eliminações e as substituições de um ou vários aminoácidos que não alteram substancialmente a capacidade do objetivo de ligar a um Nanobody da invenção levantaram contra o objetivo de tipo natural. O número de eliminações de inserções aminoácidas ou substituições está à altura preferivelmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70 aminoácidos.

Um Nanobody da invenção dirigida contra um objetivo geralmente significa Nanobody da invenção que é capaz da ligação ao seu objetivo com uma afinidade de melhor do que 10⁻⁶ M.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito acima em que pelo menos um Nanobody da invenção é uma seqüência humanizada.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito acima em que pelo menos um Nanobody da invenção é um Camelidae VHH anticorpo.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito acima, em que o referido Nanobody da invenção é uma seqüência homóloga, uma

porção funcional, ou uma porção funcional de uma sequência homóloga de nanobody de o comprimento completo da invenção.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito acima, em que os referidos que construtos de polipeptídios é uma sequência homóloga do referido construto polipeptídio, uma porção funcional disso, de uma sequência homóloga de uma porção funcional disso.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito acima, além disso compreendendo pelo menos um Nanobody da invenção dirigida contra uma ou várias proteína de soro, especialmente uma ou várias proteína de soro humana.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito acima em que os referidos pelo menos que uma (humana) proteína de soro é alguma de albumina de soro (humana), imunoglobulinas de soro (humanas), proteína ligada com tiroxina (humana), transferrina (humano), ou fibrinogênio (humano) ou um fragmento disso.

Segundo um aspecto específico, mas não-restritivo da invenção, os polipeptídios da invenção contêm, além de um ou vários nanocorpos da invenção, pelo menos um Nanobody contra uma albumina de soro humano. Embora esses nanocorpos contra uma albumina de soro humano possam ser como geralmente descritos em W04/062551 ou nas novas referências citadas

nisso, segundo uma modalidade de execução em

particular preferencial, mas não-restritiva, os referidos que o Nanobody contra uma albumina de soro humano se compõe de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), em que: i) O CDR1 é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

SFGMS [SEQ ID n. 44]
 LNLMG [SEQ ID n. 45]
 INLLG [SEQ ID n. 46]
 10 NYWMY; [SEQ ID n. 47]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

15 (1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
 20 inserções aminoácidas, em comparação com as acima mencionadas seqüências aminoácidas;

e em que:

ii) O CDR2 é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

25 SISGSGSDTLYADSVKG [SEQ ID n. 48]
 TITVGDSTNYADSVKG [SEQ ID n. 49]
 TITVGDSTSYADSVKG [SEQ ID n. 50]

SINGRGDDTRYADSVKG [SEQ ID n. 51]

AISADSSTKKNYADSVKG [SEQ ID n. 52]

AISADSSDKRYADSVKG [SEQ ID n. 53]

RISTGGGYSYYADSVKG [SEQ ID n. 54]

5 ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm
pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais
preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente
pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido
na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima
10 mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente
uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
15 contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
inserções aminoácidas, em comparação com as acima
mencionadas seqüências aminoácidas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que
têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme
20 definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas
acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente
uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
na presente); e/ou

25 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
inserções aminoácidas, em comparação com as acima

mencionadas seqüências aminoácidas;

e em que:

iii) O CDR3 é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

5 DREAQVDTLDFDY [SEQ ID n. 55]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

15 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as acima mencionadas seqüências aminoácidas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

25 (2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou

inserções aminoácidas, em comparação com as acima mencionadas seqüências aminoácidas;

ou do grupo composto de :

GGSLSR [SEQ ID n. 56] RRTWHSEL [SEQ ID n. 57] GRSVRS
 5 [SEQ ID n. 58] GRGSP [SEQ ID n. 59]

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

10 (1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
 15 inserções aminoácidas, em comparação com as acima mencionadas seqüências aminoácidas.

Em outro aspecto, a invenção refere-se ao Nanobody contra vWF, que se compõem de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 complementar a determinação de
 20 regiões (CDR/a CDR3 respectivamente), que é escolhido do grupo composto de nanocorpos com aquela das combinações seguintes de CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente: - CDR1:
 SFGMS; CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG; CDR3: GGSLSR;

- CDR1: LNLMG; CDR2: T1TVGDSTNYADSVKG; CDR3:
 25 RRTWHSEL;

- CDR1: INLLG; CDR2: TITVGDSTSYADSVKG; CDR3:
 RRTWHSEL;

- CDR1: SFGMS; CDR2: SINGRGDDTRYADSVKG; CDR3:
GRSVSRS;

- CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3:
GRGSP;

5 - CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3:
GRGSP;

- CDR1: NYWMY; CDR2: RISTGGGYSYYADSVKG;
CDR3:
DREAQVDTLDFDY.

10 Nos nanocorpos da invenção que compreendem as
combinações do CDR'S acima mencionadas, cada CDR pode ser
substituído por um CDR escolhido do grupo composto de
seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%,
preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo
15 menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade
de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com o
CDR'S mencionado; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente
uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido
20 na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só
contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
inserções aminoácidas, em comparação com as acima
mencionadas seqüências aminoácidas;

25 e/ou escolhido do grupo composto de seqüências
aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 (como indicado no parágrafo
precedente) "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido

na presente) com o CDR mencionado(s) um do acima mencionado seqüências aminoácidas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as acima mencionadas seqüências aminoácidas.

Contudo, dos nanocorpos da invenção que compreendem as combinações do CDR'S acima mencionadas, nanocorpos que compreendem um ou vários do CDR'S enumerado anteriormente são em particular preferidos; os nanocorpos compreensão de dois ou mais do CDR'S enumerado anteriormente são mais em particular preferidos; e os nanocorpos compreensão de três do CDR'S enumerado anteriormente são mais em particular preferidos.

Nesses nanocorpos contra uma albumina de soro humano, as regiões de Armação FR1 a FR4 são preferivelmente como definidos mais acima para os nanocorpos da invenção.

nanocorpos em particular preferidos contra uma albumina de soro humano são escolhidos do grupo composto de SEQ ID NO's: 107-121. Esses correspondem ao nanocorpos contra uma albumina de soro humano de SEQ ID NO's: 61 para 67, SEQ ID NO's 87 para 89 e SEQ ID NO's 100-104 da aplicação provisória dos Estados Unidos co-pendente de solicitante "nanocorpos™ Melhorado intitulado contra Fator

Alfa de Necrose Tumoral" com uma data que entra do dia 18 de Maio de 2005.

Mais geralmente, nanocorpos contra a albumina de soro conveniente para uso na invenção são descritos na
5 solicitação internacional pelo solicitante intitulado "albumina de soro proteína de ligação" com uma data de arquivamento internacional do dia 17 de Maio de 2006.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um ácido nucléico que codifica um construto de polipeptídio
10 conforme descrito acima.

Outra modalidade de execução da presente invenção é uma composição que compreende um construto de polipeptídio conforme descrito acima e pelo menos um agente trombolítico, para administração simultânea, separada ou subsequente a um
15 sujeito.

Outra modalidade de execução da presente invenção está uma composição conforme descrito acima em que os referidos que o agente trombolítico é algum de estafiloquinase, ativador plasminogênico de tecido, estreptoquinase,
20 estreptoquinase de cadeia única, uroquinase e complexo de estreptoquinase acil plasminogênico.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio conforme descrito anteriormente, ou um ácido nucléico conforme descrito anteriormente, ou uma
25 composição como descrito acima de para o uso no tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens que se relacionam com agregação mediana de plaqueta ou disfunção disso.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um uso de um construto de polipeptídio conforme descrito anteriormente, ou um ácido nucléico conforme descrito anteriormente, ou uma composição como descrito acima para a
5 preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens que se relacionam com agregação mediana de plaqueta ou disfunção disso.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio, ácido nucléico ou a composição
10 conforme descrito acima ou um uso de um construtos de polipeptídios, ácido nucléico ou composição conforme descrito acima em que as referidas desordens são algum que resulta de ataque de isquemia cerebral transiente, angina instável ou estável, angina pectoris, enfarte cerebral,
15 enfarte do miocárdio, doença oclusiva arterial periférica, restenose, enxerto de desvio coronário, ou substituição de válvula de artéria coronária e intervenções coronárias tal angioplastia, stenting, endarterectomia carótida ou aterectomia.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio, ácido nucléico ou a composição
20 conforme descrito acima ou um uso de um construtos de polipeptídios, ácido nucléico ou composição conforme descrito acima em que as referidas desordens são alguma da formação de um trombo não-oclusivo, a formação de um trombo
25 oclusivo, formação trombo arterial, oclusão coronária aguda, restenose, restenose depois de PCTA ou stenting, trombo

formação em artérias estenosadas, hiperplasia depois angioplastia, aterectomia ou stenting arterial, síndrome oclusiva em um sistema vascular ou a falta de revelação de artérias de doente.

5 Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio, ácido nucléico ou a composição conforme descrito acima ou um uso de um construtos de polipeptídios, ácido nucléico ou composição conforme descrito acima em que os referidos que a desordem é a placa
10 ou a formação trombo em altos ambientes absolutos.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um construto de polipeptídio, ácido nucléico ou a composição conforme descrito anteriormente ou um uso de um construtos de polipeptídios conforme descrito acima em que os referidos
15 que construtos de polipeptídios é administrado intravenosamente, subcutaneamente, oralmente, sublingualmente, topicamente, nasalmente, vaginalmente, retalmente ou pela inalação.

Outra modalidade de execução da presente invenção é
20 uma composição que compreende um construto de polipeptídio conforme descrito acima ou um ácido nucléico que codifica os referidos que o construtos de polipeptídios, ou uma composição conforme descrito acima e um veículo farmacologicamente aceitável.

25 Outra modalidade de execução da presente invenção é um método de produzir um polipeptídio conforme descrito acima, compreendendo

(a) cultivo de células hospedeiras compreendendo ácido nucléico capaz de codificar um polipeptídio conforme descrito acima em condições que permitem a expressão do polipeptídio, e, (b) recuperação do polipeptídio produzido da cultura.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um método conforme descrito acima, em que as referidas células hospedeiras são bacterianas ou levedura.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um método para tratar dispositivos médicos invasivos para impedir agregação mediana de plaqueta em volta do sítio da invasão que compreende o passo do revestimento de dito dispositivo com um construto de polipeptídio conforme descrito acima.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um dispositivo médico invasivo que para logra agregação mediana de plaqueta em volta do sítio da invasão, em que os referidos que o dispositivo é coberto de um construto de polipeptídio conforme descrito acima.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um método de identificar um agente que modula compreender a agregação mediada por plaqueta

(a) contatar com construtos de polipeptídios conforme descrito acima com um polipeptídio correspondente ao seu objetivo, ou um fragmento disso, na presença e a ausência de um modulador candidato em condições que permitem a ligação entre ditos polipeptídios, e

(b) medir a ligação entre os polipeptídios do passo (a), em que uma redução na ligação na presença do referido modulador candidato, quanto à ligação na ausência do referido modulador candidato identificado o referido modulador candidato como um agente que modula a agregação platelet-mediatizada.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um conjunto para proteger agentes que modulam a agregação mediada por plaqueta segundo o método conforme descrito acima.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um agente desconhecido que modula a agregação mediada por plaqueta identificada segundo o método conforme descrito acima.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um método de diagnosticar uma doença ou a desordem caracterizada pela disfunção da agregação mediada por plaqueta que compreende os passos de :

(a) contatar uma amostra com um construtos de polipeptídios conforme descrito acima, e

(b) o descobrimento da ligação do referido construto de polipeptídios à referida amostra, e

(c) a comparação da ligação descobriu no passo (b) com um padrão, em que uma diferença na ligação quanto à referida amostra é o diagnóstico de uma doença ou desordem caracterizada pela disfunção da agregação mediada por plaqueta.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um conjunto que protege para diagnosticar uma doença ou desordem caracterizada pela disfunção da agregação mediada por plaqueta segundo o método conforme descrito acima.

5 Outra modalidade de execução da presente invenção é um conjunto conforme descrito acima da compreensão de um construto de polipeptídio conforme descrito acima.

Nos polipeptídios da invenção, um ou vários nanocorpos da invenção que são dirigidos contra um objetivo podem ser da mesma seqüência. Alternativamente eles podem não ter todos a mesma seqüência. É dentro dos limites da invenção que um polipeptídio da invenção compreende o anti-nanocorpos objetivo da invenção que não compartilham todos a mesma seqüência, mas que são dirigidos contra o mesmo objetivo, ou
10 fragmento disso, um ou vários antígenos disso.
15

Ele é outro aspecto da invenção que o polipeptídio da invenção compreende dois ou mais nanocorpos da invenção, em que quaisquer dois nanocorpos da invenção são dirigidos contra epitopes/alvos diferentes, isto é, contra algum de vWF, vWF domínio de A1, domínio de A1 de vWF ativado,
20 domínio vWF A3.

Outro aspecto da invenção é um polipeptídio biespecífico da invenção que compreende um Nanobody da invenção dirigida contra o domínio de A1 vWF, o domínio de A1 de vWF ativado, e outro Nanobody da invenção dirigida
25 contra vWF A3 domínio. Dito polipeptídio biespecífico da invenção inibe a interação entre vWF e colágeno, e a

interação entre vWF e plaquetas.

Segundo um aspecto da presente invenção um polipeptídeo da invenção pode compreender dois ou mais nanocorpos da invenção que foram juntados. os nanocorpos da invenção pode ser idêntico na seqüência e dirigido contra o
5 mesmo objetivo ou antígeno.

Dependendo do número de VHHS ligado, um VHH multivalente pode ser bivalente (2 VHHS), trivalente (3 VHHS), tetravalente (4 VHHS) ou ter umas mais altas
10 moléculas de valência.

A presente invenção também se relaciona ao achado que um polipeptídeo da invenção que, além disso, compreende um ou vários nanocorpos da invenção cada um dirigido contra uma proteína de soro de um sujeito, surpreendentemente prolongou
15 significativamente a meia-vida na circulação do dito sujeito comparado com a meia-vida do anti-Nanobody objetivo da invenção (ões) quando não a parte dos referidos construtos. Além disso, acima citado construtos foram encontrados para expor as mesmas propriedades favoráveis de VHHS como alta
20 estabilidade que permanece intactos em ratos, resistência de pH extrema, alta estabilidade de temperatura e alta afinidade de objetivo. A proteína de soro pode ser qualquer proteína conveniente encontrada no soro de sujeito, ou fragmento disso. Em um aspecto da invenção, a proteína de
25 soro é albumina de soro, imunoglobulinas de soro, proteína ligada com tiroxina, transferrina, ou fibrinogênio. Dependendo do uso desejado como a meia-vida requerida para

tratamento eficaz e/ou compartimentalização do antígeno de objetivo, o VHH-parceiro pode ser dirigido a uma da acima mencionada proteína de soro.

Tais construtos são capazes de fazer circular no soro do sujeito por vários dias, reduzindo a frequência do tratamento, a inconveniência ao sujeito e resultando em um custo reduzido do tratamento. Além disso, é um aspecto da invenção que a meia-vida do polipeptídeo da invenção revelada na presente pode ser controlada pelo número de nanobodies de proteína anti-soro do construto da presente invenção. Uma meia-vida controlável é desejável em várias circunstâncias, por exemplo, na aplicação de uma dose determinada de um polipeptídeo terapêutico da invenção.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um polipeptídeo da invenção como mencionado na presente, além disso compreendendo um agente trombolítico.

Dito agente trombolítico pode ser não-covalentemente ou covalentemente ligado a um Nanobody da invenção via meios não-covalentes ou covalentes. Tais meios covalentes são descritos mais adiante. Os meios Não-covalentes incluem via uma interação de proteína como biotina/estreptavidina, ou via um imunocjugado.

Alternativamente, o agente trombolítico pode ser administrado simultâneo, separado ou subsequente a respeito de um polipeptídeo da invenção.

Outro aspecto da invenção é uma composição que compreende pelo menos um polipeptídeo da invenção e pelo

menos um agente trombolítico, para administração simultânea, separada ou subsequente a um sujeito.

Um aspecto da invenção é um método para tratar administração de compreensão de doença autoimune a um indivíduo uma quantidade eficaz de pelo menos um polipeptídeo da invenção e pelo menos um agente trombolítico, simultaneamente, separadamente ou em seqüência.

Outro aspecto da invenção é um conjunto que contém pelo menos um polipeptídeo da invenção e pelo menos um agente trombolítico para administração simultânea, separada ou subsequente a um sujeito. É um aspecto da invenção que o conjunto pode ser usado segundo a invenção. É um aspecto da invenção que o conjunto pode ser usado para tratar as doenças como citado na presente.

Por meios de administração simultâneos que o polipeptídeo e o agente trombolítico são administrados a um sujeito ao mesmo tempo. Por exemplo, como uma mistura ou uma composição que compreende disseram componentes. Os exemplos incluem, mas não são limitados a uma solução administrada intravenosamente, uma pastilha, creme líquida, tópica, etc., em que cada preparação compreende os componentes do interesse.

Por que polipeptídeo de meios de administração separado e agente trombolítico são administrados a um sujeito ao mesmo tempo ou substancialmente o mesmo tempo. Os componentes estão presentes no conjunto como preparações

separadas, não misturadas. Por exemplo, o polipeptídeo e

o agente de trombolítico pode estar presente no conjunto como pastilhas individuais. As pastilhas podem ser administradas ao sujeito engolindo ambas as pastilhas ao mesmo tempo, ou uma pastilha diretamente depois do outro.

Por meios de administração seqüentes que o polipeptídeo e o agente trombolítico são administrados a um sujeito em seqüência. O polipeptídeo e o agente trombolítico estão presentes no conjunto como preparações separadas, não misturadas. Há um intervalo de tempo entre doses. Por exemplo, um componente poderia ser administrado até 336, 312, 288, 264, 240, 216, 192, 168, 144, 120, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1, ou 0.5 horas depois de outro componente.

Na administração subsequente, um componente pode ser administrado uma vez, ou qualquer número de tempos e em várias doses antes e/ou depois da administração de outro componente. A administração subsequente pode ser combinada com a administração simultânea ou subsequente.

Os usos médicos do polipeptídeo da invenção descrita mais adiante, também se aplique à composição que compreende um polipeptídeo da invenção e pelo menos um polipeptídeo agente trombolítico, para administração simultânea, separada ou subsequente a um sujeito como revelado aqui anteriormente.

Os agentes de Trombolítico segundo a invenção podem incluir, por exemplo, estafiloquinase, ativador

plasminogênico de tecido, estreptoquinase, estreptoquinase de cadeia única, uroquinase e complexo de estreptoquinase acil plasminogênico.

O nanocorpos da invenção pode ser juntado para formar
5 algum do polipeptídio da invenção revelada na presente compreendendo mais de um Nanobody da invenção que usa métodos conhecidos na técnica ou qualquer futuro método. Por exemplo, eles podem ser fundidos pela ligação cruzada química reagindo resíduos aminoácidos com um agente
10 derivatização orgânico como descrito por Blattler e al, Bioquímica 24,1517-1524; EP294703. Alternativamente, o Nanobody da invenção pode ser fundido geneticamente ao nível de ADN isto é, um construto polinucleotídeo formado que codifica o polipeptídio completo da invenção que compreende
15 um ou vários anti-nanobodies alvo da invenção e um ou vários nanobodies de proteína anti-soro da invenção. Um método que para produz bivalente ou multivalente VF-, o polipeptídio da invenção é revelado na aplicação de patente PCT WO 96/34103. Um modo de juntar múltiplos nanobodies da invenção é através
20 da via genética ligando Nanobody da invenção que codifica seqüências diretamente ou via um linker de peptídeo. Por exemplo, o fim de C-terminal do primeiro Nanobody da invenção pode ser ligado ao fim do N-terminal do seguinte Nanobody da invenção. Este modo de vinculação pode ser
25 estendido para ligar nanocorpos adicionais da invenção para a construção e a produção de construtos tri-, tetra-, etc. funcionais.

O polipeptídeo da invenção revelada na presente pode ser feito pelo técnico experimentado segundo os métodos conhecidos na técnica ou qualquer futuro método. Por exemplo, VHHS pode ser obtido usando métodos conhecidos na técnica como imunizando um camelo e obtendo hibridomas 5 disto, ou clonando uma biblioteca de nanocorpos da invenção que usa técnicas de biologia moleculares conhecidas na seleção de arte e subsequente usando fago-exposição.

Os nanocorpos têm uma estrutura única que se compõe de um domínio variável único. As moléculas de VHH derivaram de anticorpos Camelidae estão entre os domínios de ligação de antígeno intatos menores conhecidos (aproximadamente 15 kDa, ou 10 vezes menores do que um IgG convencional) e daqui são bem ajustados em direção à entrega a tecidos densos e para o 10 acesso do espaço limitado entre macromoléculas que participam em ou começam o processo da plaqueta mediadas a agregação.

Apesar do pequeno tamanho de nanobodies, e portanto vantagens para penetração, é ainda surpreendente que uma tão 20 pequena molécula possa inibir interações entre o grande polímero como vWF (até 60 monômeros) e colágeno e com uma tão alta eficiência. Foi descrito que só as grandes formas multiméricas de vWF são hemostaticamente ativas (Furlan, M. 1996, Ann. Hematol. 72:341-348). A ligação de multiméricas 25 vWF a colágeno ocorre com - mais alta afinidade de 100 vezes do que a ligação de monoméricas vWF fragmentos.

Os resultados de experimentos de alto corte indicam

que uma dose mais baixa pode ser administrada a pacientes. Por isso, menos efeitos colaterais são esperados (como imunogenicidade ou problemas de sangramento).

Em outra modalidade de execução da presente invenção, um polipeptídeo da invenção compreende um ou vários nanocorpos da invenção dirigida ao mesmo objetivo, e além disso compreende um ou vários nanocorpos da invenção dirigida ao mesmo objetivo mas a um epítopo diferente no mesmo domínio.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um polipeptídeo da invenção em que o número de nanocorpos da invenção dirigida ao mesmo objetivo é dois ou mais.

Em outra modalidade de execução da presente invenção, um polipeptídeo da invenção compreende um ou vários nanocorpos da invenção dirigida a um domínio do mesmo objetivo, e um ou vários nanocorpos da invenção dirigida ao mesmo objetivo mas a outro domínio do mesmo objetivo. Os exemplos de domínios diferentes poderiam ser A1 e domínios A3 de vWF

Ele é aquele o aspecto não-restritivo da invenção que pelo menos um VHH dirigido ao domínio de A1 em um polipeptídeo heteroespecíficos da invenção reconhece a conformação ativa de vWF. Tal polipeptídeo da invenção pode ter efeitos anti-trombóticos superiores em comparação com o VHH'S monoméricas. O experimento de perfusão foi executado em uma câmara de fluxo, estudar agregação de plaqueta sob alto corte para estudar os efeitos dos polipeptídeo da

invenção.

A descoberta de naturalmente ocorrer nanocorpos da invenção em lhama, dromedário e camelo revelou uma nova classe de moléculas terapêuticas que combinam as vantagens de anticorpos monoclonais, por exemplo, especificidade, toxicidade baixa com as vantagens de pequenas moléculas, por exemplo, penetração de tecido e estabilidade. Infelizmente, o desenvolvimento de produtos terapêuticos apropriados baseados nessa proteína tem o desconto de ser Camelidae derivado, e portanto não ser humano. A proteína não-humana contém resíduos aminoácidos que podem ser imunogênicos quando injetados em um paciente humano. Embora os estudos tenham mostrado que VHH Camelidae-derivados não são imunogênicos quando injetado em ratos, substituindo resíduos de Camelidae por resíduos humanos é preferível. Esses polipeptídeos humanizados devem ser substancialmente não-imunogênicos em seres humanos, mas reter a afinidade e a atividade do polipeptídeo de tipo natural.

O resultado de humanização é preferivelmente que imunogenicidade sobre a administração em pacientes humanos é menor ou não existente. Humanização de um polipeptídeo, segundo a invenção presente, compreende um passo de substituir um ou vários dos Camelidae aminoácidos pelo seu duplo humano como encontrado na seqüência de consenso humana, sem aquele polipeptídeo que perde o seu caráter típico, isto é, a humanização não afeta significativamente a capacidade de ligação do antígeno do polipeptídeo

resultante.

Os WO 04/062551 e a nova descrição na presente descrevem alguns exemplos preferidos, mas não-restritivos dos resíduos aminoácidos do domínio variável de anticorpo (VHH) que pode ser modificado sem diminuir a afinidade nativa do domínio para antígeno e reduzindo o seu imunogenicidade com respeito a uma espécie heteróloga; o uso de VHHS tendo modificações nos resíduos identificados que são úteis para a administração à espécie heteróloga; e ao VHH assim modificado. Mais especificamente, a invenção também abrange a preparação de VHHS modificados, que são modificados para administração a seres humanos, o próprio VHH resultante, e o uso de tal VHHS "humanizado" no tratamento de doenças em seres humanos.

Como mencionado em WO 04/062551 e na nova descrição na presente, a humanização de polipeptídios VHH requer a introdução e mutagenese de só um número limitado de aminoácidos em uma cadeia de polipeptídio única sem a perda dramática de atividade de inibição e/ou ligação. Isto é, em contraste com a humanização de scFv, Fab, (Fab) 2 e IgG, que requer a introdução de modificações aminoácidas em duas cadeias, a cadeia leve e pesada e a preservação da união de ambas as cadeias.

Uma técnica humanização pode ser executada por um método que compreende a substituição de algum dos resíduos seguintes sozinhos ou em combinação: posições de FR1 1, 5, 28 e 30, o Hallmark aminoácido na posição 37, 44, 45 e 47 em

FR2, resíduos de FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 e 94 e posições 103, 104, 108 e 111 em FR4; numeração segundo a numeração de Kabat.

Os nanocorpos da invenção têm um alto grau da homologia a germline humano VH DP-47. A nova humanização também pode implicar a introdução e mutagenese de uma quantidade limitada de aminoácidos em uma cadeia de polipeptídio única. Isto é, em contraste com a humanização de scFv, Fab, (Fab) 2 e IgG, que requer a introdução de modificações aminoácidas em duas cadeias, a cadeia leve e pesada e a preservação da união de ambas as cadeias.

Os polipeptídios contêm resíduos parecidos a um ser humanos em FR2. A humanização também pode implicar mutagenese de resíduos em FR1 na posição 1 e 5 que foram introduzidos pelo escorvador usado para clonagem de repertório e não ocorrer naturalmente na seqüência de lhama. A Mutagenese daqueles resíduos não resultou na perda de atividade de inibição e/ou ligação. A humanização de FR1 também requereu mutagenese da posição 28 e 30. A Mutagenese daqueles resíduos também não resultou na perda de atividade de inibição e/ou ligação.

A humanização também pode implicar mutagenese de resíduos em FR3 na posição 74, 75, 76, 83, 84, 93, 94. A Mutagenese daqueles resíduos não resultou na perda de atividade de inibição e/ou ligação.

A humanização também pode implicar mutagenese de resíduos em FR4 na posição 104, 108 e 111. A Mutagenese de

Q108L resultou no nível de produção mais baixo em *Escherichia coli*. A posição 108 é exposta a solvente em VHH camelídeo, enquanto em anticorpos humanos esta posição é enterrada na interface VH-VL (Spinelli, 1996; Nieba, 1997).

5 Na posição VHS isolada 108 é exposta a solvente. A introdução de um hidrofóbico não-polar Leu em vez de polar não mudado que Gln pode ter um efeito drástico na dobrabilidade/estabilidade intrínseca da molécula.

Uma modalidade de execução da presente invenção é um método que para humaniza um VHH compreendendo os passos de:

(a) substituição de algum dos resíduos seguintes sozinhos ou em combinação: posições de FR1 1, 5, 28 e 30,

o Hallmark aminoácido na posição 37, 44, 45 e 47 em FR2,

15 Resíduos de FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 e 94,

e posições 103, 104, 108 e 111 em FR4;

numeração segundo a numeração de Kabat.

Os exemplos de tais seqüências humanizadas são dados mais adiante e na listagem de seqüência em anexo.

20 O uso de anticorpos derivados de fontes como rato, ovelhas, cabra, coelho etc., e derivados humanizados disso como um tratamento para condições que requerem uma modulação da agregação associada por plaqueta, é problemático para várias razões. Os anticorpos tradicionais não são estáveis
25 na temperatura ambiente, e têm de ser refrigerados para preparação e armazenamento, requerendo equipamento de laboratório refrigerado necessário, armazenamento e

transporte, que aumentam o tempo e a despesa. A refrigeração não é às vezes fatível em países em desenvolvimento. Os rendimentos da expressão de ditas moléculas de Fab são muito baixos e o método da produção é muito de trabalho intensivo. Além disso, a fabricação ou a produção em escala modesta de ditos anticorpos são caras porque os sistemas celulares mamíferos necessários para a expressão de anticorpos intatos e ativos requer altos níveis do suporte quanto a tempo e equipamento, e os rendimentos são muito baixos. Além disso, os anticorpos tradicionais têm uma atividade de ligação que depende de pH, e daqui é imprópria para uso em ambientes fora da variedade de pH fisiológica habitual como, por exemplo, no tratamento de hemorragia gástrica, cirurgia gástrica. Além disso, os anticorpos tradicionais são movediços em pH baixo ou alto e daqui não convenientes para administração oral. Contudo, foi demonstrado que os anticorpos camelídeos resistem condições ásperas, como pH extremo, reagentes desnaturantes e altas temperaturas (Ewert S e al, Bioquímica 2002 19 de março; 41 (11):3628-36), fazendo assim eles convenientes para administração por administração oral. Além disso, os anticorpos tradicionais têm uma atividade de ligação que depende da temperatura, e daqui é imprópria para uso em ensaios ou conjuntos executados em temperaturas fora de variedades biologicamente de temperatura ativas (p. ex. $37 \pm 20^{\circ}\text{C}$).

Os nanocorpos e os polipeptídios da invenção não só possuem as características vantajosas de anticorpos

convencionais, como toxicidade baixa e alta seletividade, mas eles também expõem propriedades adicionais. Eles são mais solúveis, significando que eles podem ser fornecidos e/ou administrados em mais altas concentrações comparadas com anticorpos convencionais. Eles são estáveis na 5 significação de temperatura ambiente eles podem estar preparados, fornecidos e/ou transportados sem o uso do equipamento de refrigeração, transmitindo um custo, tempo e economias ambientais. Outras características vantajosas comparando com anticorpos convencionais incluem a meia-vida 10 curta na circulação que pode ser modulada segundo a invenção por, por exemplo, a união de albumina, um biespecífico nanobody com uma especificidade contra a albumina e outro contra o objetivo, união de Fe, VFIH que liga (VHHS 15 bivalente) ou por pegilação. Uma meia-vida curta e controlável é desejável procedimentos para cirúrgicos, por exemplo, que requerem uma inibição da agregação mediada por plaqueta por um tempo limitado período. Também, quando os problemas sangradores ocorrem ou outras complicações, a 20 dosagem pode ser abaixada imediatamente. Os polipeptídios da presente invenção também retêm a atividade de ligação em um pH e temperatura fora daqueles de variedades fisiológicas habituais, que significa que eles podem ser úteis em situações de pH extremo e temperatura que requerem uma 25 modulação da agregação mediada por plaqueta, como na cirurgia gástrica, controle da hemorragia gástrica, ensaios executados na temperatura ambiente etc. Os polipeptídios da

presente invenção também expõem uma estabilidade prolongada em extremos de pH, significando que eles seriam convenientes para a entrega pela via oral. Os polipeptídios da presente invenção podem ser rentavelmente produzidos através de fermentação em organismos hospedeiros de recombinante convenientes como *Escherichia coli* e levedura; diferentemente de anticorpos convencionais que também requerem facilidades de cultura de célula de mamíferos caras, os níveis realizáveis da expressão são altos. Os exemplos de rendimentos dos polipeptídios da presente invenção são 1 para 10 mg/ml (*E. coli*) e até 1 g/l (levedura). Os polipeptídios da presente invenção também expõem a alta afinidade de ligação para uma larga variedade de tipos de antígeno diferentes, e capacidade de ligar a epitopes não reconhecidos por anticorpos convencionais; por exemplo, eles expõem muito tempo estruturas de laço baseado em CDR com o potencial para penetrar em cavidades e inibição de função de enzima anexa. Além disso, como a ligação freqüentemente ocorre através do laço CDR3 só, é visto que os peptídeos derivados de CDR3 podem ser usados terapeuticamente (Desmyter et al., *J Biol Chem*, 2001, 276: 26285-90). Os polipeptídios da invenção são também capazes de reter a capacidade de ligação plena como proteína de fusão com uma enzima ou toxina. Além disso, poderia ser esperado que o trombocitopenia indesejável causado pelo receptor Fc:Fc mediadas a ativação da agregação de plaqueta e/ou F (ab') (2) - mediadas ligação cruzada de plaquetas que

foi observado usando IgG intacto ou F (ab') (2) terapêuticamente in vivo (ver Cauwenberghs N. e al, a Arteriosclerose, Trombose e a biologia Vascular, 2000, 20: 1347), será evitado no uso de VHH, desde que VHH não contém
5 nenhum Fc e não é bivalente. Portanto os polipeptídios da invenção, homólogos ou porções funcionais disso fornecem um custo considerável e o tempo salvando no tratamento e o diagnóstico de condições relacionadas à agregação mediada por plaqueta, e o paciente na necessidade dos referidos
10 polipeptídios encontraria menos dos problemas associados com agentes convencionais.

A agregação mediada por plaqueta é o processo em que vWF-ligado o colágeno adere a plaquetas e/ou receptores de plaqueta, enfim resultando em ativação de plaqueta. A
15 ativação de plaqueta leva à ligação de fibrinogênio, e finalmente à agregação de plaqueta. É dentro dos limites da presente invenção para fornecer polipeptídios que modulam os processos que compreendem a agregação mediada por plaqueta como ligação de vWF-colágeno, adesão de receptor de vWF-
20 plaqueta, adesão de receptor de colágeno-plaqueta, ativação de plaqueta, fibrinogênio agregação de plaqueta e/ou ligação.

Segundo um aspecto da invenção um polipeptídio da invenção pode ser uma seqüência homóloga de um polipeptídio
25 de corpo inteiro da invenção. Segundo outro aspecto da invenção, um polipeptídio da invenção pode ser uma porção funcional de um polipeptídio de corpo inteiro da invenção.

Segundo outro aspecto da invenção, um polipeptídio da invenção pode ser uma seqüência homóloga de um polipeptídio de comprimento cheio da invenção. Segundo outro aspecto da invenção, um polipeptídio da invenção pode ser uma porção funcional de uma seqüência homóloga de um polipeptídio de comprimento cheio da invenção. Segundo um aspecto da invenção um polipeptídio da invenção pode compreender uma seqüência de um polipeptídio da invenção.

Segundo um aspecto da invenção um Nanobody da invenção usada para formar um polipeptídio da invenção pode ser um Nanobody completo da invenção (p. ex. um VHH) ou uma seqüência homóloga disso. Segundo outro aspecto da invenção, um Nanobody da invenção usada para formar o polipeptídio da invenção pode ser uma porção funcional de um Nanobody completo da invenção. Segundo outro aspecto da invenção, um Nanobody da invenção usada para formar o polipeptídio da invenção pode ser uma seqüência homóloga de um Nanobody completo da invenção. Segundo outro aspecto da invenção, um Nanobody da invenção usada para formar o polipeptídio da invenção pode ser uma porção funcional de uma seqüência homóloga de um Nanobody completo da invenção.

Segundo outro aspecto da invenção um polipeptídio da invenção pode ser uma seqüência homóloga da seqüência de pais. Segundo outro aspecto da invenção, um polipeptídio da invenção pode ser uma seqüência de pai de porção funcional. Segundo outro aspecto da invenção, um polipeptídio da invenção pode ser uma porção funcional de uma seqüência

homóloga da seqüência de pais.

Como usado na presente, uma seqüência homóloga pode compreender adições, eliminações ou substituições de um ou vários aminoácidos, que não alteram substancialmente as características funcionais do polipeptídio. O número de
5 eliminações aminoácidas ou substituições está à altura preferivelmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43,
10 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70 aminoácidos.

Uma seqüência homóloga segundo a presente invenção inclui polipeptídios extensos pela adição de aminoácidos
15 para formar o anticorpo de cadeia pesada humano ou o domínio único humano anticorpo de cadeia pesada, que não alteram substancialmente as características funcionais do polipeptídio não modificado.

Onde a seqüência homóloga indica a identidade de
20 seqüência, ele significa uma seqüência que apresenta uma alta identidade de seqüência (mais de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, identidade de seqüência de 95% ou de 98%) com a seqüência de pais, e é preferivelmente caracterizada por propriedades semelhantes da seqüência de pais, a saber
25 afinidade, a referida identidade calculada usando métodos conhecidos.

Alternativamente, uma seqüência homóloga também pode

ser qualquer seqüência aminoácida que resulta de substituições permitidas em qualquer número de posições da seqüência de pais segundo a fórmula mais adiante:

- Ser substituído por Ser, Thr, Gly, e Asn;
- 5 Arg substituído por um de Arg, His, Gim, Lys, e Glu;
- Leu substituído por um de Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, e Val;
- Pro substituído por um de Pro, Gly, Ala, e Thr;
- Thr substituído por um de Thr, Pro, Ser, Ala, Gly,
- 10 His, e Gln; Ala substituído por um de Ala, Gly, Thr, e Pro;
- Val substituído por um de Val, Met, Tyr, Phe, Ile, e Leu;
- Gly substituído por um de Gly, Ala, Thr, Pro, e Ser;
- Ile substituído por um de Ile, Met, Tyr, Phe, Val, e
- 15 Leu;
- Phe substituído por um de Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val, e Leu; Tyr substituído por um de Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val, e Leu; His substituído por um do Seu, Glu, Lys, Gln, Thr, e Arg;
- 20 Gln substituído por um de Gim, Glu, Lys, Asn, His, Thr, e Arg; Asn substituído por um de Asn, Glu, Asp, Gim, e Ser;
- Lys substituído por um de Lys, Glu, Gln, His, e Arg;
- Asp substituída por uma de Asp, Glu, e Asn;
- 25 Glu substituído por um de Glu, Asp, Lys, Asn, Gim, His, e Arg; Met substituído por um dos Met, Phe, Ile, Val, Leu, e Tyr.

Um homólogo segundo a presente invenção pode referir-se a seqüências de nucleotídeos de mais de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ou 1000 nucleotídeos capaz a hibridizar ao complemento inverso da seqüência de nucleotídeos capaz de codificar um polipeptídeo em condições 5 hibridização estritas (como aqueles descritos por SAMBROOK et al., a Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, Nova York).

Como usado na presente, uma porção funcional envia a um Nanobody da invenção do comprimento suficiente tal que a 10 interação do interesse é mantida com a afinidade de $1 \cdot 10^{-6}$ M x ou melhor.

Alternativamente uma porção funcional de um Nanobody da invenção compreende uma eliminação parcial da seqüência aminoácida completa e ainda mantém o sítio(s) de ligação e o 15 domínio(s) de proteína necessário para a ligação de e interação com o objetivo.

Alternativamente uma porção funcional de algum do Nanobody da invenção é um polipeptídeo que compreende uma 20 eliminação parcial da seqüência aminoácida completa e que ainda mantém o sítio(s) de ligação e o domínio(s) de proteína necessário para a inibição da ligação de vWF a colágeno.

Alternativamente uma porção funcional de qualquer Nanobody da invenção é um polipeptídeo que compreende uma 25 eliminação parcial da seqüência aminoácida completa e que ainda mantém o sítio(s) de ligação e o domínio(s) de

proteína necessário para a ligação de e interação com o domínio A1 de vWF.

Alternativamente uma porção funcional de qualquer Nanobody da invenção é um polipeptídio que compreende uma
5 eliminação parcial da seqüência aminoácida completa e que ainda mantém o sítio(s) de ligação e o domínio(s) de proteína necessário para a ligação de e interação com colágeno.

Alternativamente uma porção funcional compreende uma
10 eliminação parcial da seqüência aminoácida completa de um polipeptídio e que ainda mantém o sítio(s) de ligação e o domínio(s) de proteína necessário para a ligação de e interação com o antígeno contra o qual foi levantado. Ele inclui, mas não é limitado a domínios VHH.

15 Tão usado na presente, uma porção funcional como ele se refere a uma seqüência de polipeptídio refere-se a menos de 100% da seqüência (p. ex., 99%, 90%, 80%, 70%, 60% 50% etc.), mas compreendendo de 5 ou mais aminoácidos.

Uma porção como ele se refere a uma seqüência de
20 nucleotídeos que codifica uma seqüência de polipeptídio refere-se

a menos de 100% da seqüência (p. ex., 99%, 90%, 80%, 70%, 60% 50% etc.), mas - compreensão de 15 ou mais nucleotídeos.

25 Um aspecto da presente invenção é a administração de um polipeptídio da invenção segundo a invenção pode evitar a necessidade para injeção. A terapêutica baseada em anticorpo

convencional tem o potencial significativo como fármacos porque eles têm a especificidade seleta ao seu objetivo e uma toxicidade inerente baixa, contudo, eles têm um desconto importante: eles são relativamente movediços, e sensíveis ao esgotamento por proteases. Isto significa que as fármacos de anticorpo convencionais não podem ser administradas oralmente, sublingualmente, topicamente, nasalmente, vaginalmente, retalmente ou pela inalação porque eles não são resistentes ao pH baixo nesses sítios, a ação de proteases nesses sítios e no sangue e/ou por causa do seu grande tamanho. Eles têm de ser administrados pela injeção (intravenosamente, subcutaneamente, etc.) superar alguns desses problemas. A administração pela injeção requer o treinamento de especialista para usar uma seringa hipodérmica ou a agulha corretamente e seguramente. Ele além disso requer o equipamento estéril, uma formulação líquida do polipeptídio terapêutico, a embalagem de frasco do referido polipeptídio em uma forma estéril e estável e, do sujeito, um sítio conveniente para a entrada da agulha. Além disso, os sujeitos comumente experimentam estresse físico e psicológico antes de e para receber uma injeção.

Um aspecto da presente invenção supera esses problemas da arte prévia, fornecendo os polipeptídios construtos da presente invenção. Ditos construtos são suficientemente pequenos, resistentes e estáveis para ser entregue oralmente, sublingualmente, topicamente, nasalmente, vaginalmente, retalmente ou pela inalação substancial sem a

perda da atividade. Os polipeptídios construído da presente invenção evitam a necessidade para injeções, não são só economias de custo/tempo, mas são também mais convenientes e mais cômodos para o sujeito.

5 Uma modalidade de execução da presente invenção é um polipeptídeo da invenção para uso em tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta que é capaz de passar através do
10 ambiente gástrico sem que a substância seja desativada.

 Como conhecido por pessoas experimentadas na técnica, uma vez na posse do referido polipeptídeo da invenção, a tecnologia de formulação pode ser aplicada para lançar uma quantidade máxima do polipeptídeo na posição certa (no
15 estômago, no cólon, etc.). Este método de administração é importante para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de desordens cujos objetivos são localizados no sistema intestinal.

 Um aspecto da invenção é um método para tratar,
20 impedir e/ou aliviar os sintomas de uma desordem suscetível à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta que é capaz de passar através do ambiente gástrico sem ser desativado, por oralmente administrando a um sujeito um polipeptídeo da invenção.

25 Outra modalidade de execução da presente invenção é um uso de um Nanobody ou o polipeptídeo da invenção para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou

aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta que é capaz de passar através do ambiente gástrico sem ser desativado.

5 Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ao sistema intestinal sem que a referida substância seja desativada, por oralmente administrando a um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

10 Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à circulação sanguínea de um sujeito sem que a substância seja desativada, por oralmente administrando a um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da
15 invenção.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um Nanobody ou o polipeptídio da invenção para uso em tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas ou desordens suscetível à modulação por uma substância que controla a
20 agregação mediada de plaqueta ministrada ao trato vaginal e/ou retal.

Em um exemplo não-restritivo, uma formulação segundo a invenção compreende um Nanobody ou o polipeptídio da invenção, na forma de um gel, creme, supositório, filme, ou
25 na forma de uma esponja ou como um anel vaginal que lentamente lança o ingrediente ativo dentro de algum tempo (tais formulações são descritas em EP 707473, EP 684814, US

5629001).

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ministrada ao trato vaginal e/ou retal, por administração vaginalmente e/ou retalmente a um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um uso de um Nanobody ou o polipeptídio da invenção para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ministrada ao trato vaginal e/ou retal.

Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ao trato vaginal e/ou retal sem ser dita substância que é desativada, administrando ao trato vaginal e/ou retal de um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à circulação sanguínea de um sujeito sem que a referida substância seja desativada, administrando ao trato vaginal e/ou retal de um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um Nanobody ou o polipeptídio da invenção, para usar em

tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de desordens suscetível à modulação por uma substância que controla a plaqueta mediadas a agregação ministrado ao nariz, tratamento respiratório superior e/ou pulmão.

5 Em um exemplo não-restritivo, uma formulação segundo a invenção, compreende um Nanobody ou o polipeptídio da invenção na forma de um borrifo nasal (p. ex. um aerossol) ou inalador. Desde o Nanobody ou o polipeptídio da invenção é pequeno, ele pode conseguir o seu objetivo muito mais
10 efetivamente do que moléculas IgG terapêuticas.

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ministrado ao trato respiratório
15 superior e pulmão, administrando a um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção, pela inalação através da boca ou nariz.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um uso de um Nanobody ou o polipeptídio da invenção para a
20 preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ministrada ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão, sem que o referido polipeptídio seja desativado.

25 Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ao nariz, trato respiratório superior e

pulmão sem inativação, administrando ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão de um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Um aspecto da invenção é um método que para
5 administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à circulação sanguínea de um sujeito sem inativação administrando ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão de um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

10 Uma modalidade de execução da presente invenção é um Nanobody ou o polipeptídio da invenção para uso em tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ministrada à mucosa
15 intestinal, em que os referidos desordens aumentam a permeabilidade da mucosa intestinal. Por causa do seu pequeno tamanho, um Nanobody ou o polipeptídio da invenção podem passar pela mucosa intestinal e atingir a circulação sanguínea mais eficientemente em sujeitos que sofrem de
20 desordens que causam um aumento na permeabilidade da mucosa intestinal.

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação
25 mediada de plaqueta ministrada à mucosa intestinal, em que os referidos desordens aumentam a permeabilidade da mucosa intestinal, por oralmente administrando a um sujeito um

Nanobody ou o polipeptídeo da invenção.

Este processo pode ser até adicionalmente realçado por um aspecto adicional da presente invenção - o uso de transportadoras de transporte ativas. Neste aspecto da invenção, VHH é fundido a uma transportadora que realça a 5 transferência através da parede intestinal na circulação sanguínea. Em um exemplo não-restritivo, esta "transportadora" é um segundo VHH que é fundido ao VHH terapêutico. Tais construtos de fusão são feitos usando 10 métodos conhecidos na técnica. O VHH "de transportadora" liga especificamente a um receptor na parede intestinal que induz uma transferência ativa através da parede.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um uso de um Nanobody ou o polipeptídeo da invenção para a 15 preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta ministrada à mucosa intestinal, em que os referidos desordens aumentam a permeabilidade da mucosa intestinal.

Um aspecto da invenção é um método que para 20 administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à mucosa intestinal sem ser desativada, administrando oralmente a um sujeito um Nanobody ou o polipeptídeo da invenção.

Um aspecto da invenção é um método que para 25 administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à circulação sanguínea de um sujeito sem

ser desativada, administrando oralmente a um sujeito um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Este processo pode ser até adicionalmente realizado por um aspecto adicional da presente invenção - o uso de transportadoras de transporte ativas. Neste aspecto da invenção, um Nanobody ou o polipeptídio da invenção conforme descrito na presente é fundido a uma transportadora que realça a transferência através da parede intestinal na circulação sanguínea. Em um exemplo não-restritivo, esta "transportadora" é um VHH que é fundido ao referido polipeptídio. Tais construtos de fusão são feitos utilizando métodos conhecidos na técnica. O VHH "de transportadora" liga especificamente a um receptor na parede intestinal que induz uma transferência ativa através da parede.

Uma modalidade de execução da presente invenção é um Nanobody ou o polipeptídio da invenção para uso em tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta que é capaz de passar através dos tecidos abaixo da língua com efetividade. Uma formulação do referido Nanobody ou o polipeptídio da invenção, por exemplo, uma pastilha, borrifo, uma gota é colocada embaixo da língua e adsorvida através das membranas de muco na rede capilar embaixo da língua.

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação

mediada de plaqueta que é capaz de passar através dos tecidos abaixo da língua com efetividade, por administração sublingual a um sujeito Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

5 Outra modalidade de execução da presente invenção é um uso do Nanobody ou o polipeptídio da invenção para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta
10 que é capaz de passar pelos tecidos abaixo da língua.

Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta aos tecidos abaixo da língua sem ser desativada, administrando sublingualmente a um sujeito
15 Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à circulação sanguínea de um sujeito sem ser desativada, administrando oralmente a um sujeito
20 Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Uma modalidade de execução da presente invenção é um Nanobody ou o polipeptídio da invenção para uso em tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a
25 agregação mediada de plaqueta que é capaz de passar através da pele efetivamente.

Uma formulação do referido Nanobody ou o polipeptídio

da invenção, por exemplo, uma creme, filme, borrifo, baixa, remendo, é colocada na pele e passa através dela.

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta que é capaz de passar através da pele efetivamente, por atualmente administrando a um sujeito Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Outra modalidade de execução da presente invenção é um uso do Nanobody ou o polipeptídio da invenção para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de desordens suscetíveis à modulação por uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta que é capaz de passar através da pele efetivamente.

Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à pele sem ser desativada, administrando topicamente a um sujeito Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Um aspecto da invenção é um método que para administração uma substância que controla a agregação mediada de plaqueta à circulação sanguínea de um sujeito, administrando topicamente a um sujeito Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

Em outra modalidade de execução da presente invenção, Nanobody ou o polipeptídio da invenção além disso compreende um nanobody transportador da invenção (p. ex. O VHH) que

atua como uma transportadora de transporte ativa para o transporte do referido Nanobody ou o polipeptídeo da invenção via o lúmen de pulmão ao sangue.

Nanobody ou o polipeptídeo da invenção que, além
5 disso, compreende uma transportadora que liga especificamente a um receptor presente na superfície de mucosa (células epiteliais bronquiais) resultar no transporte ativo do polipeptídeo do lúmen de pulmão ao sangue. A transportadora Nanobody da invenção pode ser
10 fundida ao Nanobody ou o polipeptídeo da invenção. Tais construtos de fusão são feitos utilizando métodos conhecidos na técnica e é descritos na presente. "A transportadora Nanobody" da invenção liga especificamente a um receptor na superfície de mucosa que induz uma transferência ativa
15 através da superfície.

Outro aspecto da presente invenção é um método para determinar que nanocorpos da invenção (p. ex. O VHHS) são ativamente transportados na circulação sanguínea sob administração nasal. Semelhantemente um VHH ingênuo ou imune
20 fago biblioteca pode ser administrado nasalmente, e depois de pontos de tempo diferentes depois da administração, o sangue ou os órgãos podem ser isolados para resgatar fagos que foram ativamente transportados à circulação sanguínea. Um exemplo não-restritivo de um receptor para transporte
25 ativo do lúmen de pulmão à circulação sanguínea é o receptor Fc N (Feto). Um aspecto da invenção inclui as moléculas VHH identificadas pelo método. Tal VHH então pode ser usado como

uma transportadora VHH para a entrega de um VHH terapêutico ao objetivo correspondente na circulação sanguínea sob administração nasal.

Uma modalidade de execução da presente invenção é um
5 Nanobody ou o polipeptídeo da invenção para uso em tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de desordens que se relacionam com agregação mediada por plaqueta ou disfunção disso. As referidas desordens incluem púrpura trombótica trombocitopénica (TTP), o ataque de isquemia
10 cerebral transiente, angina pectoris estável ou instável, enfarte cerebral, enfarte do miocárdio, doença oclusiva arterial periférica, restenose. As referidas desordens além disso incluem os que resultam de enxerto de desvio coronário, substituição de válvula de artéria coronária e
15 intervenções coronárias como angioplastia, stenting, ou aterectomia.

Outras desordens são alguma da formação de um trombo não-oclusivo, a formação de trombo oclusivo, formação trombo arterial, oclusão coronária aguda, restenose, restenose
20 depois de PCTA ou stenting, trombo formação em artérias estenosadas, hiperplasia depois angioplastia, aterectomia ou stenting arterial, síndrome oclusiva em um sistema vascular ou a falta de revelação de artérias de doente.

Um aspecto da invenção é um Nanobody ou o polipeptídeo
25 da invenção para uso no tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens ou condições que se relacionam platelet-mediada agregação ou disfunção disso, em que o referido

Nanobody ou polipeptídio da invenção são administrados intravenosamente, subcutaneamente, oralmente, sublingualmente, topicamente, nasalmente, vaginalmente, retalmente ou pela inalação.

5 Outro aspecto da invenção é o uso do Nanobody ou o polipeptídio da invenção para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens ou condições que se relacionam com agregação mediada por plaqueta ou disfunção disso, em que o referido Nanobody ou
10 polipeptídio da invenção são administrados intravenosamente, subcutaneamente, oralmente, sublingualmente, topicamente, nasalmente, vaginalmente, retalmente ou pela inalação.

Outro aspecto da invenção é um método de tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens ou condições agregação
15 mediada por plaqueta se relaciona que se relaciona ou disfunção disso, compreendendo administrando a um sujeito Nanobody ou o polipeptídio da invenção, em que o referido Nanobody heteroespecíficos ou o polipeptídio da invenção são administrados intravenosamente, subcutaneamente, oralmente,
20 sublingualmente, topicamente, nasalmente, vaginalmente, retalmente ou pela inalação.

Outro aspecto da invenção é um Nanobody ou o polipeptídio da invenção para uso no tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens ou condições que se relacionam
25 platelet-mediatizada agregação ou disfunção disso.

Outro aspecto da invenção é um uso de um polipeptídio da invenção para a preparação de um medicamento para o

tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens ou condições que se relacionam com agregação mediada por plaqueta ou disfunção disso.

Cada um pode usar Nanobody ou o polipeptídeo da invenção da presente invenção para analisar agentes que modulam a ligação do polipeptídeo a um vWF. Quando identificado em um ensaio que mede a ligação ou o referido deslocamento de polipeptídeo sozinho, os agentes terão de ser submetidos à prova funcional para determinar se eles atuam como os moduladores da agregação mediada por plaqueta. Alguns exemplos de métodos de proteção convenientes são discutidos em WO 04/062551. Naturalmente, esses métodos podem ser facilmente aplicados à proteção para moduladores candidatos que alteram a ligação entre Nanobody ou o polipeptídeo da invenção revelada na presente e vWF.

Uma célula que é útil segundo a invenção é preferivelmente selecionada do grupo composto de células bacterianas como, por exemplo, *E. coli*, células de levedura como, por exemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, células de inseto ou células de mamíferos, p. ex. conforme acima mencionado.

Uma célula que é útil segundo a invenção pode ser qualquer célula na qual uma seqüência ácida nucléica que codifica Nanobody ou o polipeptídeo da invenção pode ser ou foi introduzida de modo tal que o polipeptídeo é expresso a níveis naturais ou acima de níveis naturais, conforme definido na presente. Preferivelmente um polipeptídeo da

invenção que é expresso em uma célula expõe farmacologia normal ou perto da normal, conforme definido na presente.

Segundo uma modalidade de execução preferencial da presente invenção, uma célula é selecionada do grupo composto de COS7-células, uma célula CHO, um LM (TK-) 5 célula, uma célula NIH-3T3, célula de HEK-293, célula de K-562 ou um 1321N1 célula astrocitoma mas também outras linhas de célula transfectável.

Em geral, "a quantidade terapeuticamente eficaz", "a 10 dose terapeuticamente eficaz" e "quantidade eficaz" significa a quantidade necessária para atingir o resultado ou resultados desejados (agregação de plaqueta que trata ou impede). Uma habilidade ordinária na técnica reconhecerá que a potência e, por isso, "uma quantidade eficaz" pode variar 15 para vários nanocorpos ou polipeptídios que inibem a agregação mediada por plaqueta usada na invenção. Um experimentado na técnica pode avaliar prontamente a potência do Nanobody ou polipeptídio.

"Por farmacologicamente aceitável" se que dizer um 20 material que não é biologicamente ou de outra maneira indesejável, isto é, o material pode ser administrado a um indivíduo junto com Nanobody ou polipeptídio sem causar qualquer efeito biológico indesejável ou interagir em uma maneira deletéria com algum de outros componentes da 25 composição farmacêutica na qual é contido.

A invenção revelada na presente é útil para o tratamento ou a prevenção de uma condição da agregação

mediada por plaqueta, e compreende a administração a um sujeito de uma quantidade farmacologicamente eficaz do Nanobody ou polipeptídeo ou composição que inibe BTK e isto inibe a agregação mediada por plaqueta.

5 A invenção revelada na presente é útil para o tratamento ou a prevenção dos primeiros passos da formação trombo, e compreende a administração a um sujeito de uma quantidade farmacologicamente eficaz do Nanobody ou polipeptídeo ou composição segundo a invenção.

10 A invenção revelada na presente é útil para o tratamento ou a prevenção restenose, e compreende a administração a um sujeito de uma quantidade farmacologicamente eficaz do Nanobody ou polipeptídeo ou composição segundo a invenção.

15 Um aspecto da presente invenção é o uso de nanocorpos ou os polipeptídios da invenção para tratar ou e previne uma condição da agregação mediada por plaqueta, em um sujeito e compreende administração de uma quantidade farmacologicamente eficaz do Nanobody ou polipeptídeo em combinação com o
20 outro, como, por exemplo, aspirina.

 Um aspecto da presente invenção é o uso de nanocorpos ou os polipeptídios da invenção para tratar ou e previne uma condição da agregação mediada por plaqueta, em um sujeito e compreende administração de uma quantidade farmacologicamente
25 eficaz do Nanobody ou polipeptídeo em combinação com o outro, como, por exemplo, um agente trombolítico.

 Outro aspecto da presente invenção é um uso do

Nanobody ou o polipeptídio da invenção para tratar ou prevenir placa ou trombo em um indivíduo. A referida placa ou a formação de trombo podem ser em condições de alto desvio. Tanto em trombose como em re-oclusão, a adesão reversível ou amarração das plaquetas em alto taxa de corte é seguido por uma adesão firme através do receptor colágeno em plaquetas que resultam em ativação de plaqueta; amarração de plaquetas por vWF a colágeno exposto na parede de vaso danificada é especialmente importante sob altas condições de corte. Os inventores encontraram que o Nanobody ou polipeptídio da invenção da presente invenção inesperadamente funcionava bem em altas condições absolutas.

A presente invenção não é limitada à administração de formulações que compreendem Nanobody único ou o polipeptídio da invenção. É dentro dos limites da invenção para fornecer tratamentos de combinação em que uma formulação é administrada a um paciente na necessidade disso que compreende mais de um Nanobody ou o polipeptídio da invenção.

As condições da agregação mediada por plaqueta incluem, mas não são limitadas a, angina instável, angina estável, angina pectoris, formação de embolus, trombose profundamente vã, síndrome urêmico hemolítico, anemia hemolítica, a falha renal aguda, complicações trombolíticas, púrpura trombótica trombocitopénica, congelopatia intravascular disseminada, trombose, doença cardíaca coronária, complicações tromboembólicas, enfarte do

miocárdio, restenose, e formação de trombose atrial em
fibrilação atrial, angina instável crônica, ataques e
derrames isquêmicos transientes, doença vascular periférica,
trombose arterial, pre-eclampsia, embolia, restenose e/ou
5 trombose depois de angioplastia, endarterectomia carótida ,
anastomose de enxertos vasculares e exposição crônica a
dispositivos cardiovasculares. Tais condições também podem
resultar de tromboembolismo e reoculsão durante e depois da
terapia trombolítica, depois de angioplastia, e depois do
10 desvio de artéria coronária.

É bem conhecido na técnica como determinar a inibição
da agregação mediada por plaqueta que usa os testes padrão
descritos na presente, ou usa outros testes semelhantes.
Preferivelmente, o método resultaria em pelo menos uma
15 redução de 10% da agregação mediada por plaqueta, inclusive,
por exemplo, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,
90%, 100%, ou qualquer quantidade no meio, mais
preferivelmente em 90%.

Semelhantemente o método resultaria em pelo menos uma
20 redução de 10% do cálcio intracelular mobilisation
inclusive, por exemplo, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%,
70%, 80%, 90%, 100%. Semelhantemente o método resultaria em
pelo menos uma redução de 10% do nível de PLCg 2 fosforilado
inclusive, por exemplo, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%,
25 70%, 80%, 90 100%.

A redução pode ser medida, por exemplo, comparando a
impedância ótica em uma agregômetro de plaqueta de

cronologia. Qualquer outro método de medição conhecido também pode ser usado. Por exemplo, (1) sobre a estimulação colágeno, o nível de aumentos de mobilização de cálcio intracelulares colágeno-induzidos dentro de algum tempo e portanto a medição pode incluir o medir do nível de cálcio intracelular colágeno-induzido ou (2) sobre a estimulação colágeno, o nível de fosforilado PLCg 2 aumentos dentro de algum tempo e portanto a medição pode incluir o medir do nível de fosforilado PLCg 2.

10 As células podem ser contatadas em vitro, por exemplo, acrescentando Nanobody ou o polipeptídio da invenção ao meio de cultura (pela infusão contínua, pela entrega no bolo, ou modificando o meio para um meio que contém Nanobody ou o polipeptídio) ou acrescentando Nanobody ou polipeptídio ao fluido extracelular in vivo (por entrega local, entrega sistêmica, inalação, injeção intravenosa, bolo entrega, ou infusão contínua). A duração "do contato" com uma célula ou a população de células é determinada Nanobody ou polipeptídio está presente a níveis fisiologicamente eficazes ou a níveis supostos fisiologicamente eficazes no fluido médio ou extracelular que banha a célula ou células. Preferivelmente, a duração do contato é 1-96 horas, e mais preferivelmente, para 24 horas, mas tais tempos variariam baseado meia-vida do Nanobody ou polipeptídio e podem ser otimizadas por um experimentado na experimentação de rotina de utilização de arte.

Nanobody ou o polipeptídio útil na presente invenção

podem ser formulados como composições farmacêuticas e administrados a um hospedeiro mamífero, como um paciente humano ou um animal doméstico em várias formas adaptadas à via escolhida da administração, isto é, oralmente ou parenteralmente, por intra-nasalmente por inalação, vias intravenosas, intramusculares, tópicas ou subcutâneas.

Nanobody ou o polipeptídio da presente invenção também podem ser administrados usando métodos de administração de terapia genética. Ver, p. ex., Patente U.S. n. 5,399,346, que é incorporada por referência em sua totalidade. Usando um método de administração por terapia genética, células primárias transfetadas com o gene para Nanobody ou o polipeptídio da presente invenção podem ser adicionalmente transfetadas com promotores específicos de tecido para visar órgãos específicos, tecido, enxertos, tumores, ou células.

Portanto, o presente Nanobody ou polipeptídio pode ser sistemicamente administrado, p. ex., oralmente, em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável como um diluente inerte ou uma transportadora comestível assimilável. Eles podem ser incluídos em cápsulas de gelatina de capas duras ou suaves, podem ser compressos em pastilhas, ou incorporados diretamente com a comida da dieta do paciente. Para a administração terapêutica oral, Nanobody ou o polipeptídio podem ser combinados com um ou vários excipientes e usados na forma de pastilhas ingeríveis, pastilhas bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolinhos delgados, e assim por diante. Tais

composições e as preparações devem conter pelo menos 0.1% do Nanobody ou polipeptídio. A porcentagem das composições e preparações pode ser, naturalmente, variada e pode estar convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 5 60% do peso de uma forma de dosagem de unidade dada. A quantidade do Nanobody ou polipeptídio em tais composições terapeuticamente úteis é tal que um nível de dosagem eficaz será obtido.

As pastilhas, comprimidos, pílulas, cápsulas, e assim 10 por diante também podem conter o seguinte: aglutinantes como goma tragacanth, acácia, amido de grão ou gelatina; excipientes como fosfato bicálcico; um agente que se desintegra como amido de grão, amido de batatas, algínico ácido e assim por diante; um lubrificante como magnésio 15 estearato; e um agente de adoçamento como sacarose, fructose, lactose ou aspartame ou um agente de sabor como hortelã, o óleo de pirola, ou sabor de cereja pode ser acrescentado. Quando a forma de dosagem de unidade é uma cápsula, ela pode conter, além de materiais do tipo acima 20 mencionado, um portador líquido, como um óleo vegetal ou um glicol de polietileno. Vários outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou modificar de outra maneira a forma física da forma de dosagem de unidade sólida. Por exemplo, as pastilhas, as pílulas, ou as cápsulas podem ser 25 cobertas de gelatina, cera, goma-laca ou açúcar e assim por diante. Um xarope ou o elixir podem conter Nanobody ou o polipeptídio, a sacarose ou fructose como um agente de

adoçamento, metila e propilparabenos como preservantes, uma tintura e sabor como sabor de cereja ou cor de laranja. Naturalmente, qualquer material usado na preparação de qualquer forma de dosagem de unidade deve ser
5 farmacêuticamente aceitável e substancialmente não-tóxica nas quantidades empregadas. Além do mais, Nanobody ou o polipeptídeo podem ser incorporados em preparações e dispositivos de administração prolongada.

Nanobody ou o polipeptídeo também podem ser
10 administrados intravenosamente ou intraperitonealmente por infusão ou injeção. As soluções do Nanobody ou polipeptídeo podem ser preparadas em água, opcionalmente misturada com um surfactante não-tóxico. As dispersões também podem ser preparadas em glicerol, glicol de polietileno líquido,
15 triacetin, e misturas disso e em óleos. Em condições ordinárias de armazenamento e uso, essas preparações contêm um conservante para prevenir o crescimento de microrganismos.

As formas de dosagem farmacêuticas convenientes para a
20 injeção ou a infusão podem incluir soluções aquosas estéreis ou dispersões ou pó estéril que compreende o ingrediente ativo que são adaptados para a preparação extemporânea de soluções injetáveis ou infusíveis estéreis ou dispersões, opcionalmente encapsuladas em lipossomas. Em todos os casos,
25 a forma de dosagem última deve ser estéril, fluida e estável nas condições de fabricação e armazenamento. A transportadora líquida ou o veículo podem ser um meio de

dispersão solvente ou líquido, compreendendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno líquido, e assim por diante), óleos vegetais, ésteres gliceril não-tóxicos , e 5 misturas convenientes disso. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pela formação de lipossomas, pela manutenção do tamanho de partícula requerido em caso de dispersões ou pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de microrganismos pode ser ocasionada por vários agentes 10 antibacterianos e antifúngos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, phenol, ácido sórbico, timerosal, e assim por diante. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcar, buffers ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode 15 ser ocasionada pelo uso nas composições de agentes que atrasam absorção, por exemplo, alumínio monostearato e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis estão preparadas incorporando Nanobody ou polipeptídeo na quantidade 20 requerida no solvente apropriado com vários de outros ingredientes enumerados anteriormente, como requerido, seguido pela esterilização com filtro. Em caso do pó estéril para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferenciais da preparação são a secagem à vácuo e 25 a técnicas de secagem por congelamento, que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer presente de ingrediente desejado adicional nas soluções anteriormente estéreis-

filtradas.

para administração tópica, o presente Nanobody ou o polipeptídeo podem ser aplicados na forma pura, isto é, quando eles são líquidos. Contudo, será geralmente desejável 5 administrá-los à pele como composições ou formulações, em combinação com uma transportadora dermatologicamente aceitável, que pode ser um sólido ou um líquido.

Os portadores sólidos úteis incluem sólidos finamente divididos como talco, barro, celulose microcristalina, 10 sílica, alumina e assim por diante. Os portadores líquidos úteis incluem água, hidroálcalis ou glicol ou misturas de água-álcool/glicol, nas quais o presente Nanobody ou o polipeptídeo podem ser dissolvidos ou dispersados a níveis eficazes, opcionalmente com a ajuda de surfactantes não- 15 tóxicos. Adjuvantes como fragrâncias e agentes antimicrobiais adicionais podem ser acrescentados para otimizar as propriedades para um uso dado. As composições líquidas resultantes podem ser aplicadas de almofadas absorventes, usaram para impregnar bandagens e outro 20 curativos, ou borrifados na área afetada que usa pulverizadores de aerossol ou tipo de bomba.

Os espessantes como polímero sintético, ácidos gordurosos, sais e ésteres de ácidos gordurosos, álcoois gordurosos, celulosas modificadas ou materiais minerais 25 modificados também podem ser empregados com transportadoras líquidas para formar pastas para borrifar, géis, unguentos, sabões, e assim por diante, para aplicação diretamente à

pele do usuário.

Exemplos de composições dermatológicas úteis que podem ser usadas para entregar Nanobody ou o polipeptídeo à pele são conhecidos na técnica; por exemplo, ver Jacquet et al. (U.S. Pat. N°. 4,608,392), Geria (U.S. Pat. N°. 4,992,478),
5 Smith et al. (U.S. Pat. N°. 4,559,157) e Wortzman (U.S. Pat. N°. 4,820,508).

Dosagens úteis do Nanobody ou polipeptídeo podem ser determinadas comparando sua atividade in vitro, e na
10 atividade in vivo em modelos animais. Os métodos para a extrapolação de dosagens eficazes em ratos, e outros animais, a seres humanos são conhecidos na técnica; por exemplo, ver U.S. Pat. N°. 4,938,949.

Geralmente, a concentração do Nanobody ou polipeptídeo em uma composição líquida, como uma loção, será de
15 aproximadamente 0.1-25 wt-%, preferivelmente de aproximadamente 0.5-10 wt-%. A concentração em uma composição semi-sólida ou sólida como um gel ou um pó será aproximadamente 0.15% de wt, preferivelmente aproximadamente
20 0.5-2.5 wt-%.

A quantidade do Nanobody ou polipeptídeo requereu para que o uso no tratamento varie com a via de administração, a natureza da condição que é tratada e a idade e a condição do paciente e será enfim à discricção do médico ou clínico
25 atendente. Também a dosagem do Nanobody ou polipeptídeo varia dependendo da célula objetivo, tumor, tecido, enxerto, ou órgão.

A dose desejada pode ser convenientemente apresentada em uma dose única ou como doses divididas administradas em intervalos apropriados, por exemplo, como dois, três, quatro ou mais sub-doses por dia. A própria sub-dose pode ser além
5 disso dividida, p. ex., em um número de administrações discretas livremente espaçadas; como múltiplas inalações de um insuflador ou pela aplicação de uma pluralidade de gotas no olho.

Um regime de administração pode incluir o tratamento
10 de longo prazo, diário. Por "de longo prazo" se entende pelo menos duas semanas e preferivelmente, várias semanas, meses, ou anos da duração. As modificações necessárias nesta variedade de dosagem podem ser determinadas por uma habilidade ordinária na técnica usando só experimentação de
15 rotina dada nos ensinamentos na presente. Ver Remington's Pharmaceuticals Sciences (Martin, E.W., editor 4), Mack Publishing Co, Easton, PA. A dosagem também pode ser ajustada pelo médico individual no caso de qualquer complicação.

20 A invenção provê um agente que é um modulador da agregação mediada por plaqueta.

O agente de candidato pode ser um agente sintético, ou uma mistura de agentes, ou ser um produto natural (p. ex. um extrato de planta ou cultura supernadante). Um agente de
25 candidato segundo a invenção inclui uma pequena molécula que pode ser sintetizada, um extrato natural, peptídeos, proteína, carboidratos, lipídios etc.

Os Agentes moduladores candidato de grandes bibliotecas de agentes sintéticos ou naturais podem ser protegidos. Os meios numerosos são atualmente usados para a síntese casual e dirigida de sacarida, peptídeo, e agentes baseados em ácido nucléico. As bibliotecas de agente sintéticas são comercialmente disponíveis de um número de companhias inclusive Maybridge Chemical Co (Trevillet, o Cornwall, Reino Unido), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), e Microsource (New Milford, CT).
10 Uma biblioteca química rara é disponível de Aldrich (Milwaukee, WI). As bibliotecas combinatórias são disponíveis e podem ser preparadas. Alternativamente, as bibliotecas de agentes naturais na forma de extratos bacteriano, fungoso, planta e dos animais são disponíveis de p. ex., Pan Laboratories (Bothell, WA) ou MycoSearch (NC), ou são prontamente produzíveis por métodos bem conhecidos na técnica. Adicionalmente, as bibliotecas naturais e sinteticamente produzidas e os agentes são prontamente modificados por meios químicos, físicos, e bioquímicos
15 através de convencionais.

Os agentes úteis podem ser encontrados dentro de classes químicas numerosas. Os agentes úteis podem ser agentes orgânicos, ou pequenos agentes orgânicos. Os pequenos agentes orgânicos têm um peso molecular de mais de
25 50 ainda menos de aproximadamente 2,500 daltons, preferivelmente menos de aproximadamente 750, mais preferivelmente menos de aproximadamente 350 daltons. As

classes exemplares incluem heterociclos, peptídeos, sacarídeos, esteróides, e assim por diante. Os agentes podem ser modificados para realçar a eficácia, a estabilidade, a compatibilidade farmacêutica, e assim por diante. A

5 identificação estrutural de um agente pode ser usada para identificar, gerar, ou proteger agentes adicionais. Por exemplo, onde os agentes de peptídeo são identificados, eles podem ser modificados de vários modos para realçar a sua estabilidade, como utilização de um aminoácido desnatural,

10 como um ácido D-amino, em particular D-alanina, por funcionalização do amino ou término carboxílico, p. ex. para o grupo amino, acilação ou alquilação, e para o grupo carboxilo, esterificação ou amidificação, ou o parecido.

Para análise primária, uma concentração útil de um

15 agente de candidato segundo a invenção é de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 μ M ou mais (isto é, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M etc.). A concentração de análise primária será usada como um limite superior, junto com nove concentrações adicionais, em que as concentrações adicionais

20 são determinadas reduzindo a concentração de análise primária em intervalos de meio-log (p. ex. para mais 9 concentrações) para análises secundárias ou para geração de curvas de concentração.

Um conjunto de análise de alto rendimento segundo a

25 invenção compreende todos os meios necessários e meios de comunicação para executar a detecção de um agente que modula a agregação mediada por plaqueta interagindo com um objetivo

da invenção, como, por exemplo, vWF, ou fragmento disso na presença de um polipeptídeo, preferivelmente em uma concentração na variedade de 1 µM a 1 mM. O conjunto compreende o seguinte. As células Recombinantes da invenção, compreendendo e expressando a seqüência de nucleotídeos que codifica vWF, ou fragmento disso, que é cultivado segundo o conjunto em um suporte sólido, como uma chapa de microtitragem, mais preferivelmente uma placa de microtitragem com 96 cavidades, segundo os métodos bem conhecidos à pessoa experimentada na técnica sobretudo como descrito em WO 00/02045. Alternativamente o vWF, ou o fragmento disso são fornecidos em uma forma purificada a ser imobilizada em, por exemplo, uma placa de microtitragem com 96 cavidades pela pessoa experimentada na técnica. Alternativamente o vWF, ou o fragmento disso são fornecidos no conjunto pré-imobilizado em, por exemplo, uma placa de microtitragem com 96 cavidades. Agentes moduladores segundo a invenção, em concentrações de aproximadamente 1 µM a 1 mM ou mais, são acrescentados a cavidades definidas na presença de uma concentração apropriada do Nanobody ou o polipeptídeo da invenção os referidos a concentração do referido polipeptídeo preferivelmente na variedade de 1 µM a 1 mM. Os conjuntos podem conter mais de um polipeptídeo

Os ensaios de ligação são executados como segundo os métodos já revelados na presente e os resultados são em comparação com o nível de base de, por exemplo, vWF, ou fragmento disso que liga a um polipeptídeo da invenção, mas

a ausência do agente modulador acrescentado. As cavidades que mostram pelo menos 2 vezes, preferivelmente 5 vezes, mais preferivelmente 10 vezes e o mais preferivelmente uma 100 vezes ou mais aumento ou redução no vWF-polipeptídeo que
5 liga (por exemplo) comparando com o nível da atividade a ausência do modulador, são selecionados para nova análise.

A invenção provê conjuntos úteis para proteção para os moduladores da agregação plaquet-mediatizada, bem como conjuntos úteis para o diagnóstico de doenças ou desordens
10 caracterizado por de-regulação de agregação mediada por plaqueta. Os conjuntos úteis segundo a invenção podem incluir um vWF isolado, ou o fragmento disso. Alternativamente, ou além do mais, um conjunto pode compreender células transformadas para expressar vWF, ou o
15 fragmento disso. Em uma nova modalidade de execução, um conjunto segundo a invenção pode compreender um polinucleotídeo que codifica vWF, ou o fragmento disso. Em uma ainda nova modalidade de execução, um conjunto segundo a invenção pode compreender os escorvadores específicos úteis
20 para a amplificação de vWF, ou fragmento disso os Conjuntos úteis segundo a invenção podem compreender um Nanobody ou o polipeptídeo da invenção. Um conjunto segundo a invenção pode compreender as células transformadas para expressar o referido polipeptídeo.

25 Os conjuntos podem conter mais de um polipeptídeo. Em uma nova modalidade de execução, um conjunto segundo a invenção pode compreender um polinucleotídeo codificação de

uma macromolécula, por exemplo, vWF, ou fragmento disso. Em
uma ainda nova modalidade de execução, um conjunto segundo a
invenção pode compreender os escorvadores específicos úteis
para a amplificação de uma macromolécula como, por exemplo,
5 vWF, ou fragmento disso. Todos os conjuntos segundo a
invenção compreenderão os itens determinados ou combinações
de itens e materiais de embalagem, por isso. Os conjuntos
também incluirão instruções para uso.

A invenção também provê dispositivos médicos invasivos
10 cobertos de um Nanobody ou o polipeptídeo da invenção ou um
agente que resulta de um método de proteção da invenção para
usa em dispositivos que requerem o mesmo. Os exemplos não-
restritivos de dispositivos incluem tubulação cirúrgico,
dispositivos de oclusão, dispositivos protéticos. A
15 aplicação para os referidos que os dispositivos incluem
procedimentos cirúrgicos que requerem uma modulação da
agregação mediada por plaqueta em volta do sítio da invasão.

Uma modalidade de execução do presente é um método
para tratar dispositivos médicos invasivos para prevenir a
20 agregação mediana de plaqueta em volta do sítio da invasão
que compreende o passo do revestimento de dito dispositivo
com um Nanobody ou o polipeptídeo da invenção ou agente
segundo a invenção.

Outra modalidade de execução do presente é uns
25 dispositivos médicos invasivos que logra a agregação mediana
de plaqueta em volta do sítio da invasão, em que os
referidos que o dispositivo é coberto de um Nanobody ou o

polipeptídeo da invenção ou agente segundo a invenção.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para a prevenção e/ou o tratamento de pelo menos uma desordem mediada por agregação (conforme descrito na presente), o referido método compreendendo a administração, a um sujeito na necessidade disso, de uma quantidade farmacologicamente ativa de um Nanobody da invenção, de um polipeptídeo da invenção, e/ou de uma composição farmacêutica que compreende o mesmo.

No contexto da presente invenção, o termo "a prevenção e/ou o tratamento" não só compreende a prevenção e/ou o tratamento da doença, mas também geralmente compreendem a prevenção do ataque da doença, redução de velocidade ou reversão do progresso de doença, prevenção ou redução de velocidade do ataque de um ou vários sintomas associados com a doença, redução e/ou alívio de um ou vários sintomas associados com a doença, redução da gravidade e/ou a duração da doença e/ou de qualquer sintoma associado com isso e/ou prevenção de um novo aumento na gravidade da doença e/ou de qualquer sintoma associado com isso, prevenção, redução ou reversão de qualquer dano fisiológico causado pela doença, e geralmente qualquer ação farmacológica que é benéfica ao paciente que é tratado.

O sujeito a ser tratado pode ser qualquer animal de sangue quente, mas é especialmente um mamífero, e mais especialmente um ser humano. Como estará claro para a pessoa experimentada, o sujeito a ser tratado será especialmente

uma pessoa que sofre de, ou em perigo de, as doenças e desordens mencionadas na presente.

A invenção se refere a um método para a prevenção e/ou o tratamento de pelo menos uma doença ou desordem que pode ser prevenida e/ou tratada administrando um Nanobody ou polipeptídeo da invenção a um paciente, o referido método compreendendo a administração a um sujeito na necessidade disso, de uma quantidade farmacologicamente ativa de um Nanobody da invenção, de um polipeptídeo da invenção, e/ou de uma composição farmacêutica que compreende o mesmo.

Mais especialmente, a invenção se refere a um método para a prevenção e/ou o tratamento de pelo menos uma doença ou desordem escolhida do grupo composto das doenças e desordens enumerados na presente, o referido método compreendendo a administração, a um sujeito na necessidade disso, de uma quantidade farmacologicamente ativa de um Nanobody da invenção, de um polipeptídeo da invenção, e/ou de uma composição farmacêutica que compreende o mesmo.

Em outra modalidade de execução, a invenção se refere a um método para a imunoterapia, e especialmente para imunoterapia passiva, cujo método compreende a administração, a um sujeito que sofre de ou está em perigo das doenças e desordens mencionados na presente, uma quantidade farmacologicamente ativa de um Nanobody da invenção, de um polipeptídeo da invenção, e/ou de uma composição farmacêutica que compreende o mesmo.

Nos acima mencionados métodos, os nanocorpos e/ou os

polipeptídios da invenção e/ou as composições que compreendem o mesmo podem ser administrados em qualquer maneira conveniente, dependendo da formulação farmacêutica específica ou composição a ser usada. Portanto, os nanocorpos e/ou os polipeptídios da invenção e/ou as composições que compreendem os mesmos, por exemplo, podem ser administrados oralmente, intraperitonealmente (p. ex. intravenosamente, subcutaneamente, intramuscularmente, ou via qualquer outra via de administração que acesse o trato gastrointestinal), intranasalmente, transdermicamente, topicamente, por meio de um supositório, pela inalação, novamente dependendo da formulação farmacêutica específica ou composição a ser usada. O clínico será capaz de selecionar uma via conveniente de administração e uma formulação farmacêutica conveniente ou composição a ser usada em tal administração, dependendo da doença ou desordem a ser prevenida ou tratada e outros fatores bem conhecidos ao clínico.

Como mencionado na presente e como estará claro para a pessoa experimentada, condições para agudas e complicações (isto é, como pode ocorrer com algumas desordens mediadas por agregação mencionadas na presente), normalmente a administração diretamente no torrente sanguíneo por infusão ou injeção ou qualquer outro meio conveniente será preferido.

O nanocorpos e/ou os polipeptídios da invenção e/ou as composições que compreendem o mesmo são administrados

segundo um regime do tratamento que é conveniente para a prevenção e/ou o tratamento da doença ou desordem a ser prevenida ou tratada. O clínico será geralmente capaz de determinar um regime de tratamento conveniente, dependendo de fatores como a doença ou desordem a ser prevenida ou tratada, a gravidade da doença a ser tratada e/ou a gravidade dos sintomas disso, o Nanobody específico ou o polipeptídeo da invenção a ser usado, a via específica de administração e formulação farmacêutica ou composição a ser usada, a idade, gênero, peso, dieta, a condição geral do paciente, e fatores semelhantes bem conhecidos ao clínico.

Geralmente, o regime de tratamento compreenderá a administração de um ou vários nanocorpos e/ou os polipeptídios da invenção, ou de uma ou várias composições que compreendem os mesmos, em uma ou várias quantidades farmacêuticamente eficazes ou doses. A quantidade(s) específica ou as doses a serem administradas podem ser determinadas pelo clínico, novamente baseado nos fatores citados anteriormente.

Geralmente, para a prevenção e/ou o tratamento das doenças e desordens mencionadas na presente e dependendo da doença específica ou desordem a ser tratada, a potência do Nanobody específico e o polipeptídeo da invenção a ser usado, a via específica de administração e a formulação farmacêutica específica ou composição usada, os nanocorpos e polipeptídios da invenção serão geralmente administrados em uma quantidade entre 1 grama e 0.01 microgramas por peso de

corpo de quilograma por dia, preferivelmente entre 0.1 gramas e 0.1 microgramas por peso de corpo de quilograma por dia, como aproximadamente 1, 10, 100 ou 1000 microgramas por peso de corpo de quilograma por dia, qualquer continuamente (p. ex. pela infusão), como uma dose diária única ou como múltiplas doses divididas durante o dia. O clínico será geralmente capaz de determinar uma dose diária conveniente, dependendo dos fatores mencionados na presente. Também ficará claro que em casos específicos, o clínico pode decidir desviar-se dessas quantidades, por exemplo, com base nos fatores citados anteriormente e o seu juízo de perito. Geralmente, um pouco de orientação nas quantidades a ser administradas pode ser obtida das quantidades normalmente administradas para anticorpos convencionais comparáveis ou fragmentos de anticorpo contra o mesmo objetivo administrado via essencialmente a mesma rota, considerando contudo diferenças em afinidade/avidez, eficácia, biodistribuição, meia-vida e fatores semelhantes bem conhecidos à pessoa experimentada.

Normalmente, no acima mencionado método, um Nanobody único ou o polipeptídio da invenção serão usados. É contudo dentro dos limites da invenção para usar dois ou mais nanocorpos e/ou polipeptídios da invenção em combinação.

Os nanocorpos e os polipeptídios da invenção também podem ser usados em combinação com um ou vários compostos ou princípios novos farmacologicamente ativos, isto é, como um regime de tratamento combinado, que pode ou pode não levar a

um efeito sinérgico. Novamente, o clínico será capaz de selecionar tais novos compostos ou princípios, bem como um regime de tratamento combinado conveniente, baseado nos fatores citados anteriormente e o seu juízo de perito.

5 Especialmente, os nanocorpos e os polipeptídios da invenção podem ser usados em combinação com outros compostos farmacologicamente ativos ou princípios que são ou podem ser usados para a prevenção e/ou o tratamento das doenças e desordens citadas na presente, em consequência do qual um
10 efeito sinérgico pode ou não ser obtido. Os exemplos de tais compostos e princípios, bem como vias, métodos e formulações farmacêuticas ou composições que para os administram serão claros ao clínico, e, por exemplo, incluirão, mas não são limitados a heparina, aspirina (p.
15 ex. Aspepic®), Plavix e/ou Reopro.

 Quando duas ou mais substâncias ou princípios devem ser usados como parte de um regime de tratamento combinado, eles podem ser administrados via a mesma rota de administração ou via rotas diferentes da administração, em
20 essencialmente o mesmo tempo ou em tempos diferentes (p. ex. essencialmente simultaneamente, consecutivamente, ou segundo um regime alternante). Quando as substâncias ou os princípios são administrados para ser simultaneamente via a mesma rota de administração, eles podem ser administrados
25 como formulações farmacêuticas diferentes ou composições ou parte de uma formulação farmacêutica combinada ou composição, como estará claro para a pessoa experimentada.

Também, quando duas ou mais substâncias ativas ou princípios devem ser usados como parte de um regime de tratamento combinado, cada uma das substâncias ou princípios pode ser administrada na mesma quantidade e segundo o mesmo regime que usado quando o composto ou o princípio são usados sozinhos, e tal uso combinado pode ou não levar a um efeito sinérgico. Contudo, quando o uso combinado de duas ou mais substâncias ativas ou princípios leva a um efeito sinérgico, também pode ser possível reduzir a quantidade de um, mais ou todas das substâncias ou princípios a ser administrados, ainda realizando a ação terapêutica desejada. Isto, por exemplo, pode ser útil para a evitação, a limitação ou a redução de quaisquer efeitos colaterais não desejados que se associam com o uso de uma ou várias das substâncias ou princípios quando eles são usados nas suas quantidades habituais, ainda obtendo o efeito farmacêutico ou terapêutico desejado.

A eficácia do regime de tratamento usado segundo a invenção pode ser determinada e/ou seguida em qualquer maneira conhecida por si para a doença ou a desordem implicada, como serão claras ao clínico. O clínico também será capaz, onde apropriado e ou um IM

a base de caso-por-caso, de mudar ou modificar um determinado regime de tratamento, para realizar o efeito terapêutico desejado, para evitar, para limitar ou reduzir efeitos colaterais não desejados, e/ou realizar um equilíbrio apropriado entre a realização do efeito

terapêutico desejado de um lado e evitação, limitação ou redução dos efeitos colaterais indesejados de outro lado.

O sujeito a ser tratado pode ser qualquer animal de sangue quente, mas é especialmente um mamífero, e mais
5 especialmente um ser humano. Como estará claro para a pessoa experimentada, o sujeito a ser tratado será especialmente uma pessoa que sofre de, ou em perigo de, as doenças e desordens mencionadas na presente.

A invenção também relaciona ao uso de um Nanobody ou o
10 polipeptídeo da invenção na preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de pelo menos uma doença ou desordem (p. ex. uma desordem de agregação como mencionado na presente) que pode ser prevenido e/ou tratado administrando um Nanobody ou
15 polipeptídeo da invenção a um paciente.

Geralmente, o regime de tratamento será seguido até que o efeito terapêutico desejado seja realizado e/ou contanto que o efeito terapêutico desejado seja mantido. Novamente, isto pode ser determinado pelo clínico.

Finalmente, também estará claro para a pessoa
20 experimentada que pode ser possível "enxertar" um ou vários dos CDR'S acima mencionados para os nanocorpos da invenção para outros "andaimes", inclusive, mas não limitado a, andaimes humanos ou andaimes de não-imunoglobulina. Andaimes
25 convenientes e técnicas para tal enxerto de CDR estará claro para a pessoa experimentada e é bem conhecido na técnica, vide, por exemplo, os US-A-7,180,370, WO 01/27160, EP 0

605522, EP 0 460167, os US-A-7,054,297, Nicaise et al., Protein Science (2004), 13:1882-1891; Ewert et al., Métodos, 2004 Oct; 34 (2):184-199; Kettleborough et al., Proteína Eng. Out de 1991; 4 (7): 773-783; O'Brien e Jones, Métodos Mol. Biol. 2003: 207: 81-100; e Skerra, J. Mol. Recognit. 2000: 13: 167-187, e Saerens et al., J. Mol. Biol. 2005 Sep 23; 352 (3):597-607, e as novas referências citadas na presente; e também inclua, por exemplo, as regiões de armação de outros (únicos) anticorpos de domínio. Por exemplo, as técnicas conhecidas por si para enxertando rato ou CDR's de rato para armações humanas e andaimes podem ser usadas em uma maneira análoga para fornecer a proteína quimérica que compreende um ou vários do CDR'S dos nanocorpos da invenção e um ou regiões ou seqüências de armação humanas.

Portanto, em outra modalidade de execução, a invenção compreende um polipeptídio quimérico que compreende pelo menos uma seqüência CDR escolhida do grupo composto de seqüências CDR1, as seqüências de CDR2 e as seqüências CDR3 mencionadas na presente para os nanocorpos da invenção. Preferivelmente, tal polipeptídio quimérico compreende pelo menos uma seqüência CDR escolhida do grupo composto das seqüências CDR3 mencionada na presente para os nanocorpos da invenção, e opcionalmente também pelo menos uma seqüência CDR escolhida do grupo composto das seqüências CDR1 e CDR2 mencionada na presente para os nanocorpos da invenção. Por exemplo, tal polipeptídio quimérico pode compreender uma

seqüência CDR escolhida do grupo composto das seqüências CDR3 mencionada na presente para os nanocorpos da invenção, uma seqüência CDR escolhida do grupo composto das seqüências CDR1 mencionada na presente para os nanocorpos da invenção e
5 uma seqüência CDR escolhida do grupo composto das seqüências CDR1 e CDR2 mencionada na presente para os nanocorpos da invenção. As combinações do CDR'S que são mencionadas na presente como preferidas para os nanocorpos da invenção também serão normalmente preferidas para esses polipeptídios
10 quiméricos.

nos referidos polipeptídios quiméricos, o CDR'S pode ser ligado a novas seqüências de seqüências aminoácidas e/ou ligado um a outro via seqüências aminoácidas, nas quais as referidas seqüências aminoácidas são preferivelmente
15 seqüências de armação ou são seqüências aminoácidas que atuam como seqüências de armação, ou em conjunto formam um andaime para apresentar o CDR'S. A referência é novamente feita à arte prévia mencionada no parágrafo último. Segundo uma modalidade de execução preferencial, as seqüências
20 aminoácidas são seqüências de armação humanas, por exemplo, seqüências de armação de VH3. Contudo, seqüências de armação não-humanas, sintéticas, semi-sintéticas ou de não-imunoglobulina também pode ser usadas. Preferivelmente, as seqüências de armação usadas são tais que (1) o polipeptídio
25 quimérico é capaz de ligar xxxx, isto é, com uma afinidade que é pelo menos 1%, preferivelmente pelo menos 5%, mais preferivelmente pelo menos 10%, como pelo menos 25% e até

50% ou 90% ou mais da afinidade do correspondente Nanobody da invenção; (2) o polipeptídeo quimérico é conveniente para uso farmacêutico; e (3) o polipeptídeo quimérico é preferivelmente essencialmente não-imunogênico nas condições desejadas para uso farmacêutico (isto é, indicação, modo de administração, dose e regime de tratamento) disso (que pode ser essencialmente análogo às condições descritas na presente para o uso dos nanocorpos da invenção).

Segundo uma modalidade de execução não-restritiva, o polipeptídeo quimérico compreende pelo menos duas seqüências CDR (como acima mencionado) ligado via pelo menos uma seqüência de armação, na qual preferivelmente pelo menos uma de duas seqüências CDR é uma seqüência CDR3, com outra seqüência CDR que é um CDR1 ou seqüência CDR2. Segundo uma modalidade de execução preferencial, mas não-restritiva, o polipeptídeo quimérico compreende pelo menos duas seqüências CDR (como acima mencionado) ligado pelo menos duas seqüências de armação, nas quais preferivelmente pelo menos uma de três seqüências CDR é uma seqüência CDR3, com outras duas seqüências CDR que são seqüências CDR1 ou CDR2, e preferivelmente sendo uma seqüência CDR1 e uma seqüência CDR2. Segundo uma modalidade de execução especificamente preferencial, mas não-restritiva, os polipeptídios quiméricos têm a estrutura FR1' - CDR1 - FR2' - CDR2 - FR3' - CDR3 - FR4', no qual CDR1, CDR2 e CDR3 são como definidos na presente para o CDR'S dos nanocorpos da invenção, e FR1', FR2', FR3' e FR4' são seqüências de armação. FR1', FR2',

FR3' e FR4' pode ser especialmente Armação 1, Armação 2, Armação 3 e Armação 4 seqüências, respectivamente, de um anticorpo humano (como seqüências VH3) e/ou partes ou fragmentos de tais seqüências de Armação. É também possível
5 usar partes ou fragmentos de um polipeptídeo quimérico com a estrutura FR1' - CDR1 - FR2' - CDR2 - FR3' - CDR3 - FR4. Preferivelmente, tais partes ou fragmentos são tais que eles encontram os critérios estabelecidos no parágrafo precedente.

10 A invenção será além disso descrita agora por meio dos exemplos não-restritivos seguintes e figuras, nas quais as Figuras mostram:

Figura 1: Ligação de nanobodies a vWF em ELISA

Figura 2: Alinhamento de 12A5 homólogo nanobody
15 seqüências

Figura 3: Alinhamento de 12B6 homólogo nanobody seqüências

Figura 4: Ligação de 12A5 homólogo nanobodies a vWF em BIACORE

20 Figura 5: Ligação de 12B6 homólogo nanobodies a vWF em BIACORE

Figura 6: adesão de plaqueta em concentrações diferentes de 12B6, 12A2 e 12A5 nanobodies

Figura 7a: Ligação em ELISA a vWF para 12B6 nanobody
25 depois de aquecer em temperaturas crescentes

Figura 7b: Ligação em ELISA a vWF para 12A2 nanobody depois de aquecer em temperaturas crescentes

Figura 7c: Ligação em ELISA a vWF para 12A5 nanobody depois de aquecer em temperaturas crescentes

Figura 8a: Ligação de vWF de espécie diferente a 12B6 nanobody em ELISA

5 Figura 8b: Ligação de vWF de espécie diferente a 12A2 nanobody em ELISA

Figura 8c: Ligação de vWF de espécie diferente a 12A5 nanobody em ELISA

10 Figura 9: Ligação dos bivalentes 12B6 nanobodies a vWF em BIACORE

Figura 10: Ligação dos bivalentes 12A2 nanobodies a vWF em BIACORE

Figura 11: Ligação dos bivalentes 12A5 nanobodies a vWF em BIACORE

15 Figura 12: Ligação em ELISA a vWF dos bivalentes 12B6 nanobodies depois de aquecer em temperaturas crescentes

Figura 13: Ligação em ELISA a vWF dos bivalentes 12A2 nanobodies depois de aquecer em temperaturas crescentes

20 Figura 14: Ligação em ELISA a vWF dos bivalentes 12A5 nanobodies depois de aquecer em temperaturas crescentes

Figura 15: Alinhamento dos humanizados 12B6 nanobody seqüências

Figura 16: Ligação em ELISA a vWF de tipo natural e humanizado 12B6 nanobody

25 Figura 17: Alinhamento dos humanizados 12A2 nanobody seqüências

Figura 18: Ligação em ELISA a vWF dos humanizados 12A2

nanobodies, depois de aquecer em temperaturas crescentes

Figura 19: Ligação em ELISA a vWF dos humanizados 12A2 nanobodies

Figura 20: Alinhamento dos humanizados 12A5 nanobody
5 seqüências

Figura 21: Ligação em ELISA a vWF de tipo natural e humanizado 12A5 nanobody

Figura 22: o Alinhamento de nanobodies selecionou a forma para bivalente

Figura 23: a adesão de plaqueta em concentrações diferentes dos bivalentes (humanizou) nanobodies
10

Figura 24: o modelo de fluxo de sangue para Folts modela em babuínos

Figura 25: a organização experimental para Folts modela em babuínos
15

Figura 26: o estudo de Folts do babuíno controla o grupo. O fluxo de sangue em função do tempo é mostrado, indicando o CFRs (o representante de 2 experimentos independentes)

Figura 27: o estudo de Folts do grupo de babuíno tratado com Aspegic. O fluxo de sangue em função do tempo é mostrado, indicando o CFRs (o representante de 3 experimentos independentes)
20

Figura 28: o estudo do grupo de babuíno tratado com Heparina. O fluxo de sangue em função do tempo é mostrado, indicando o CFRs (o representante de 3 experimentos independentes)
25

Figura 29: o estudo de Folts do grupo de babuíno tratado com Plavix. O fluxo de sangue em função do tempo é mostrado, indicando o CFRs (o representante de 4 experimentos independentes)

5 Figura 30: o estudo de Folts do grupo de babuíno tratado com Reopro. O fluxo de sangue em função do tempo é mostrado, indicando o CFRs (o representante de 3 experimentos independentes)

10 Figura 31: o estudo de Folts do grupo de babuíno tratado com ALX-0081 (SEQ ID NO:98). O fluxo de sangue em função do tempo é mostrado, indicando o CFRs (o representante de 8 experimentos independentes)

Figura 32: o Fluxo lido fora do babuíno ID 6 tratou com uma combinação de Aspegic, Heparina, Plavix e ALX-0081

15 Figura 33: Médias de perda de sangue relativa em função de doses diferentes de Plavix, Reopro e ALX-0081

Figura 34: o comprimento médio de CFRs e a quantidade relativa média da perda de sangue para animais tratados com Plavix em função da dose de fármaco crescente.

20 Figura 35: o comprimento médio de CFRs e a quantidade relativa média da perda de sangue para animais tratados com Reopro em função da dose de fármaco crescente

Figura 36: o comprimento médio de CFRs e a quantidade relativa média da perda de sangue para animais tratados com ALX-0081 em função da dose de fármaco crescente

25

Figura 37: a agregação ristocetina-induzida (% , ■) e comprimento de CFRs (s, +) para cada babuíno tratado com

ALX-0081 em função de todas as doses

Figura 38: a Concentração de ALX-0081 no plasma contra o comprimento de CFRs para todos os babuínos tratados com ALX-0081

5 Figura 39: Concentração de ALX-0081 em plasma contra quantidade relativa de perda de sangue da gaze

Figura 40: o estudo de Folts do babuíno 1 tratou com ALX-0081 e vWF. O fluxo de sangue em função do tempo é mostrado, indicando o CFRs

10 Figura 41: cadeias (flechas) de plaquetas aderidas em ULvWF segregado de células endotelial estimuladas

Figura 42: a Ausência de cadeias quando as plaquetas são perfused por cima de ULvWF na presença de ALX-0081

Figura 43: experimento de perfusão de controle: as
15 cadeias de ULvWF antes (painel A, indicado com flechas vermelhas) e durante (painel B) a perfusão com o plasma normal. No painel B, as cadeias de ULvWF que são rachadas por ADAMTS-13 são indicadas com uma flecha azul e vermelha para uma parte de uma cadeia de ULvWF se afastar ou para
20 basicamente cadeias de ULvWF rachadas respectivamente

Figura 44: experimento de perfusão em presença de ALX-0081. A imagem microscópica de um campo antes (painel A) e do mesmo campo depois (painel B) a perfusão com o plasma normal. Uma cadeia de ULvWF é indicada no painel um com uma
25 flecha vermelha que é ausente no painel B devido à rachadura do ULvWF por ADAMTS-13.

Figura 45: a rachadura de A1-A2-A3 por ADAMTS-13

apresenta no plasma de consórcio normal (NPP) na ausência e a presença de ALX-0081

e em que as Tabelas, que formam uma parte integrante da descrição presente, são como se segue:

5 Tabela 8: listagem de seqüência de nanocorpos anti-vWF

 Tabela 9: rendimentos de expressão de nanocorpos anti-vWF

 Tabela 10: adesão de plaqueta em câmara de perfusão de nanocorpos anti-vWF

10 Tabela 11: listagem de seqüência de 12B6 e 12A5 homólogo nanobodies

 Tabela 12: K-on Previsto, K-off e KD valores para 12A5 homólogo nanobodies

 Tabela 13: K-on Previsto, K-off e KD valores para 12B6 homólogo nanobodies

15 Tabela 14: verdadeiro valor de KD de 12B6, 12A2 e 12A5 nanobodies

 Tabela 15: adesão de plaqueta em câmara de perfusão de 12B6, 12A2 e 12A5 nanobodies

20 Tabela 16: Concentração de 12B6, 12A2 e 12A5 nanobodies depois de aquecer em temperaturas crescentes

 Tabela 17: listagem de seqüência de nanobodies bivalente

 Tabela 18: listagem de seqüência de seqüências de linkers

25 Tabela 19: rendimentos de expressão dos bivalentes 12B6, 12A2 e 12A5 nanobodies

Tabela 20: Concentração de 12136 nanobodies bivalentes depois de aquecer em temperaturas crescentes

Tabela 21: Concentração de 12A2 nanobodies bivalente depois de aquecer em temperaturas crescentes

5 Tabela 22: Concentração de 12A5 nanobodies bivalente depois de aquecer em temperaturas crescentes

Tabela 23: adesão de plaqueta em câmara de perfusão de 12A2 nanobodies bivalente

Tabela 24: listagem de seqüência dos humanizados 12B6
10 nanobodies

Tabela 25: rendimentos de expressão de tipo nanobodies 12B6 natural e humanizado

Tabela 26: Concentração de tipo nanobodies 12B6 natural e humanizado depois de aquecer em temperaturas
15 crescentes

Tabela 27: Valores de KD do tipo para natural e humanizado 12136 nanobodies

Tabela 28: listagem de seqüência dos humanizados 12A2 nanobodies

20 Tabela 29: rendimentos de expressão de tipo natural e humanizado 12A2 nanobodies

Tabela 30: Concentração de nanobodies 12A2 de tipo natural e humanizado depois de aquecer em temperaturas crescentes

25 Tabela 31: adesão de plaqueta de nanobodies 12A2 de tipo natural e humanizado em câmara de perfusão em 0.7 e 1.5 ug/ml

Tabela 32: adesão de plaqueta de nanobodies 12A2 de tipo natural e humanizado em câmara de perfusão em 0.5, 1 e 2 ug/ml

5 Tabela 33: Valores de KD do tipo para natural e humanizado 12A2 nanobodies

Tabela 34: listagem de seqüência dos humanizados 12A5 nanobodies

Tabela 35: rendimentos de expressão de tipo natural e humanizado 12A5 nanobodies

10 Tabela 36: Concentração de nanobodies 12A5 de tipo natural e humanizado depois de aquecer em temperaturas crescentes

Tabela 37: Valores de KD do tipo para natural e humanizado 12A5 nanobodies

15 Tabela 38: listagem de seqüência de nanobodies bivalente humanizado

Tabela 39: rendimentos de expressão de nanobodies bivalente humanizado

20 Tabela 40: Concentração do Nanobody bivalente humanizado depois de aquecer em temperaturas crescentes

Tabela 41: adesão de plaqueta de tipo natural e nanobodies bivalente humanizado

Tabela 42: os babuínos usados com diferentes compostos de teste no estudo de Folts

25 Tabela 43: o Comprimento de CFRs(s) para controla animais (ND = não feito)

Tabela 44: o Comprimento de CFRs(s) para animais

tratados com AspegicTM (ND = não feito)

Tabela 45: o Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com HeparinTM (ND = não feito)

5 Tabela 46: o Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com PlavixTM (ND = não feito)

Tabela 47: o Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com ReoproTM (ND = não feito)

Tabela 48: o Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com ALX-0081 (ND = não feito)

10 Tabela 49: os babuínos usados com diferentes compostos de teste no estudo de Folts

Tabela 50: a Inibição de CFRs no Folts modela para as fármacos diferentes testadas. O número de experimentos nos quais uma inibição de CFRs foi observada nas condições diferentes mencionadas é mostrado como uma função do número total de repetições independentes daquela condição.

15 Tabela 51: Comprimento de CFRs (segundos) para cada babuíno e cada dose de Aspegic, Heparina, Plavix e ALX-0081. A dose eficaz é indicada em amarelo

20 Tabela 52: a perda de sangue quanto à segunda gaze de controle para animais tratados com PlavixTM em função da dose final (STD = desvio padrão)

Tabela 53: a perda de sangue quanto à segunda gaze de controle para animais tratados com ReoproTM em função da dose final (STD = desvio padrão)

25 Tabela 54: a perda de sangue quanto à segunda gaze de controle para animais tratados com ALX0081 em função da dose

final (STD = desvio padrão)

Tabela 55: a média da soma total de perda de sangue (= soma de perda de sangue de cinco primeiras doses de composto de teste) como quanto à segunda gaze de controle

5 Tabela 56: a perda de sangue na gaze quanto à segunda gaze de controle para cada babuíno tratado com Aspegic, Heparina, Plavix e ALX-0081 em função da dose de fármaco. A dose de fármaco eficaz na qual uma inibição completa de CFRs foi observada, é indicada em amarelo

10 Tabela 57: o% agregação de plaqueta ristocetina-induzida para cada babuíno tratado com Aspegic, Heparina, Plavix e ALX-0081 em função da dose de fármaco

Tabela 58: concentração de ALX-0081 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] em amostras de sangue obtidas em 10 minutos depois de administração

15

Tabela 59: o Comprimento do CFRs [segundos] para babuínos tratados com ALX-0081 e com vWF

Tabela 60: Volumes [μl] para preparar as misturas diferentes para o estudo da rachadura de A1A2A3 por ADAMTS

20 13.

EXEMPLOS

25

A. Seleção e proteção dos nanobodies específico para vWF e inibição de adesão de plaqueta

Exemplo 1: nanobodies monovalente específico de Antígeno

O nanobodies representados na Tabela 8 ID Números SEQ: 5 60 para 66 são obtidos de lhamas imunizadas com vWF humano ou com o domínio de A1 recombinante de vWF. Os nanobodies ligam a um 1 domínio de vWF e inibem a interação entre vWF e gplb nas plaquetas.

10 Exemplo 2: Expressão e purificação de nanobodies

O Plasmídeo foi preparado (QIAGEN, segundo as instruções de fabricantes) e foi transformado em WK6 ou células eletro-competentes TG1. Uma colônia única foi usada para começar uma cultura noturna em LB que contém glicose de 15 2% e 100 gg/ml ampicilina. Esta cultura noturna foi diluída 100 vezes em 2x300 ml TB meio que contém 100 4g/ml ampicilina, e incubou a 37°C até OD600nm = 0.5. IPTG de 1 mM foi acrescentado e a cultura foi incubada para mais 3 horas a 37°C ou durante a noite em 28°C.

20 As culturas foram centrifugadas para 20 minutos em 10000 rotações por minuto em 4°C. A pílula foi congelada durante a noite ou para 1 hora em -20°C. Depois, a pílula foi descongelada na temperatura ambiente para 40 minutos, re-suspensos em 20 ml peri buffer (NaH₂PO₄ de 50 mM e NaCl de 25 300 MM) e sacudida na temperatura ambiente para 1 hora. A fração de Periplásmico foi isolada por centrifugação para 20 minutos em 4°C em 20000 rotações por minuto. Os nanobodies

foram purificados em uma coluna de Nickel (TALON, Clontech) conforme descrito pelo fabricante e os rendimentos de expressão foram calculados como representado na Tabela 9.

5 Exemplo 3: Ligação de nanobodies a vWF em ELISA

Os nanobodies do Exemplo 1 foram testados para atando a vWF em ELISA. Por isso, uma microplaca de titragem (Nunc, Maxisorb) foi coberta do vWF (Cruz Vermelha) em uma diluição de 200 vezes e pré-aqueceu para 15 minutos a 37°C. A chapa
10 foi coberta durante a noite em 4°C. A chapa então foi lavada com o PBS-TWEEN e bloqueada para duas horas na temperatura ambiente com o PSB 1% casein_ Depois da lavagem, as amostras foram aplicadas começando em uma concentração de 10 tg/ml e 3 diluições de vezes foram feitas no PSB. Depois de um
15 período de incubação de duas horas, as chapas foram lavadas e rato o anticorpo anti-myc monoclonico em uma diluição de 1000 vezes foi aplicado para 1 hora na temperatura ambiente. As chapas foram lavadas e anti-rato-HRP policlonico (o DAKO) foi aplicado em uma diluição de 1000 vezes para uma hora na
20 temperatura ambiente. As chapas foram lavadas e ABTS/H2O2 o substrato foi aplicado. O OD 405 nm foi medido. Os resultados são mostrados na Figura 1.

Exemplo 4: Inibição de adesão de plaqueta por
25 nanobodies em uma câmara de fluxo

As amostras de proteína foram analisadas em uma câmara de perfusão. As placas de vidro Thermanox (Nunc) foram

embebidas durante a noite em etanol de 80%, enxaguado completamente com água destilada e secados no ar. Colágeno humano de placenta tipo III (Sigma) foi solubilizado em 0.05 mol ácido acético e borrifado nas placas de vidro em uma densidade final de 304g/cm² com um aerógrafo de retoque. Depois de borrifar as placas de vidro foram bloqueadas com a solução de albumina humana de 1% no PSB por pelo menos 1 hora em RT. As aspersões foram executadas com uma câmara de perfusão de passo único em condições de fluxo não-pulsátil que usam uma pequena câmara de perfusão modificada com uma altura de fenda de 0.1 mm e uma largura de fenda de 2 mm. O sangue foi obtido por punção na veia de voluntários sãos e anti-coagulado com Penta/PPACK. Placas de vidro triplicadas foram inseridas na câmara. Cinco mililitros do sangue foram pré-aquecidos a 37°C por 5 minutos com ou sem adição de 2 micrograma/ml nanobody e logo fizeram circular através da câmara por 5 minutos em uma parede cortada a uma taxa de 1600 s⁻¹ utilização de uma bomba de infusão. Depois que uma corrida de perfusão, a placa de vidro foi tomada da câmara, enxaguada em Hepes com buffer salino (Hepes de 10 mm, NaCl de 150 mm, ph 7.4), fixado em 0.5% gutaraldeído no PSB, desidratado no metanol e manchado com MayGrunwald e Giemsa (Riedel de Haen). A deposição de plaqueta foi avaliada como cobertura de superfície de plaqueta que usa microscopia leve e análise assistida por computador. Os resultados são mostrados na Tabela 10. Os nanocorpos 12B6 e 12A5 claramente inibem a adesão de plaqueta ao tipo de colágeno III na

câmara de perfusão em alta taxa de corte.

Exemplo 5: a Análise em BIACORE que para liga a vWF para homólogos nanobodies nanocorpos 12B6 e 12A5 inibe a adesão de plaqueta na câmara de perfusão. As seqüências de Homólogo foram obtidas da lhama que compreende as diferenças aminoácidas como mostrado na Tabela 11 SEQ ID Número 67 a 73. A figura 2 e 3 representa o alinhamento do 12A5 e 12136 homólogo nanobody seqüências.

o vWF foi covalentemente ligado à superfície de chip sensor via a união de amina. A superfície de CM5 do chip foi ativada pela injeção de EDC/NHS (1:1 a mistura de 0,4 m l-etil-3 (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida e N-hidroxisuccinimida de 0,1 m em água) por 7 minutos. Sobre a ativação o vWF foi injetado até que um aumento de 6000 unidades de resposta fosse descoberto. O excesso de grupos reativos foi desativado com Etanolamina-HCl de 1 m (pH 8,5) para 7 minutos. O fluxo foi guardado constante durante o procedimento de imobilização em 5 uUmin. O buffer de eluente foi HEPES de 0,01 m (pH 7,4) com NaCl de 0,15 m, EDTA de 3 mm e 0,005% Surfactante P20.

Os nanobodies 12B6 e 12A5 e a sua proteína homólogo foram analisados em BIACORE em vWF em uma concentração do nanobody de 5 pg/ml como mostrado na Figura 4 e 5. Previsto o kon, K-off e os valores de KD são representados na Tabela 12 e 13. Os nanocorpos 12A5 e 12B5 têm o melhor K-on e tarifas K-off. Os nanocorpos 12A2 e 12B6 têm a melhor tarifa

K-on, as tarifas K-off são muito comparáveis para todo os nanocorpos testado.

A tabela 14 demonstrações o verdadeiro KD avalia para vWF em BIACORE utilização de uma variedade de concentrações do nanobodies. Do jogo de curvas que foram geradas para cada nanobody, só aquelas curvas onde o equilíbrio foi conseguido, foram usadas para derivar o valor de KD via a afinidade de estado constante.

Para o tratamento de eventos agudos, a inibição rápida de vWF é muito importante, e portanto uma tarifa K-on rápida é preferida. A tarifa K-on determina a que velocidade um nanobody liga o seu objetivo (vWF) quando injetado em ser humano ou animais.

Exemplo 6: Compare a inibição nanobodies para potência na câmara de perfusão

Para comparar a potência para a inibição da adesão de plaqueta, os nanobodies 12A2, 12B6 e 12A5 foram testados na câmara de perfusão em 0.2, 0.4 e 0.6 pg/ml. O experimento foi executado usando o mesmo doador para todo o nanobodies. Os resultados são mostrados na Tabela 15 e a Figura 6. Os nanobodies mostram uma capacidade de inibição muito comparável na câmara de perfusão, com a inibição completa da adesão de plaqueta em uma concentração de 0.6 µg/ml nanobody.

Exemplo 7: Estabilidade de nanobodies em temperaturas elevadas

Uma solução de estoque de nanobodies em uma concentração de 200 gg/ml no PSB esteve preparada e dividiu-se em vários tubos. Cada tubo que contém nanobody foi incubado em temperaturas diferentes para 1 hora, logo esfriou na temperatura ambiente para 2 horas e pôs em 4°C durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em 13000 rotações por minuto, e o supernadante foi testado para OD280 nm. A concentração de supernadantes foi medida espectrometricamente e expressa como uma porcentagem da concentração na temperatura ambiente. Os resultados são resumidos na Tabela 16.

Os supernadantes também foram testados em ELISA que para liga a vWF conforme descrito acima no Exemplo 3. Como mostrado na Figura 7a (12B6), 7b (12A2) e 7c (12A5), os nanobodies são muito estáveis em temperaturas elevadas.

Exemplo 8: Reatividade cruzada dos nanocorpos com vWF de outra espécie

Uma microplaca de titragem foi coberto do rato anti-myc em 1/1000 durante a noite em 4°C. A chapa foi lavada com o PBS-TWEEN e bloqueada por duas horas na temperatura ambiente com caseína de PBS1%. Depois da lavagem, os nanobodies foram aplicados em uma concentração de 10 µg/ml em PSB. Depois de um período de incubação de 1 hora, as chapas foram lavadas e o plasma (cão, porco, ser humano, babuíno e macaco cynomologues) foi aplicado começando em uma diluição quádrupla e fazendo diluições além disso duplas no

PSB. As chapas foram incubadas para 1 hora na temperatura ambiente. As chapas foram lavadas e anti-vWF-HRP policlônico (o DAKO) foi aplicado em uma diluição de 2000 vezes para uma hora na temperatura ambiente. As chapas foram lavadas e
5 ABTS/H2O2 o substrato foi aplicado. O OD 405 nm foi medido.

Como mostrado na Figura 8a (12B6), 8b (12A2) e 8c (12A5), nanobodies 12A5, 12A2 e 12B6 são reativos zangados com ser humano, babuíno e macaco cynomologues vWF. Os nanobodies 12A2 e 12B6 são também reativos zangados com o
10 porco vWF. Esses nanobodies, por isso, podem ser testados para eficácia e segurança em porcos. Nenhum dos nanobodies é reativo zangado com o cão vWF.

B. Construção dos bivalentes nanobodies específico para vWF e Exemplo de adesão de plaqueta de inibição 9: seqüências de aminoácido dos nanocorpos bivalente
15

A tabela 17 SEQ ID Número 74 a 82 representa nanobodies bivalente construído para 12B6, 12A2 e 12A5. Os nanobodies foram ligados com o linkers representado na
20 Tabela 18 SEQ ID Número 83 a 85.

Exemplo 10: Expressão e purificação dos nanocorpos bivalente

As expressões foram executadas conforme descrito acima no Exemplo 2. Os rendimentos de expressão são resumidos na
25 Tabela 19.

Exemplo 11: Análise dos nanocorpos bivalente em

BIACORE

Os nanobodies bivalentes do Exemplo 9 foram analisados em BIAcore em 1,3 nM conforme descrito acima no Exemplo 5 para comparar as afinidades para vWF contra o monovalente nanobody. Os nanobodies bivalentes 12B6 (a Figura 9), 12A2 (a Figura 10) e 12A5 (a Figura 11) têm uma afinidade melhorada para vWF quando em comparação com o monovalente nanobody.

10 Exemplo 12: Estabilidade dos nanocorpos bivalente em temperaturas elevadas

A estabilidade dos nanocorpos bivalente foi medida conforme descrito acima no Exemplo 7. A concentração (μ g/ml) do supernadantes foi medido e expresso como uma porcentagem da concentração na temperatura ambiente. Os resultados são resumidos na Tabela 20 (bivalente 12B6), Tabela 21 (bivalente 12A2) e Tabela 22 (bivalente 12A5).

Os supernadantes foram testados em ELISA que para liga a vWF conforme descrito acima no Exemplo 3. Os supernadantes foram aplicados começando em uma diluição 1/100 e as diluições 1/5 foram feitas no PSB. Os resultados são mostrados na Figura 12 (12B6), a Figura 13 (12A2) e a Figura 14 (12A5).

25 Exemplo 13: Análise de monovalente e bivalente 12A2 na câmara de fluxo

O Nanobody 12A2 (monovalente e as formas bivalentes)

2A2H3								
1								
2A2H4								
1								
2A2H11								
1								
2A2H13								

Tabela IV:

	76N	77S	82bS	83R	84A	108L
1						
2A2H1						
1						
2A2H3						
1						
2A2H4						
1						
2A2H11						
1						
2A2H13						

5 As expressões foram executadas como descrito no Exemplo 2. Os rendimentos de expressão são resumidos na Tabela 29.

A estabilidade dos nanocorpos humanizado foi medida como descrito no Exemplo 7. A tabela 30 resume o OD280 nm concentrações ($\mu\text{g/ml}$) do supernadantes expresso como uma porcentagem da concentração em temperatura ambiente. Todos humanizado 12A2 nanobodies é muito estável para aquecer-se em temperaturas crescentes.

O ELISA da Figura 18 e 19 foi executado como descrito no Exemplo 3. 12A2H1 e 12A2H4 ligam muito bem a vWF em ELISA.

Os nanobodies foram testados na câmara de fluxo em uma concentração de 0.7 $\mu\text{g/ml}$ e 1.5 gg/ml . O mesmo doador foi usado para todos os experimentos. O experimento foi executado como descrito no Exemplo 4. Os resultados são resumidos na Tabela 31 e 32.

A afinidade dos humanizados 12A2 nanobodies para vWF foi determinada em BIACORE. Os valores de KD são resumidos na Tabela 33.

Exemplo 16: Humanização de 12A5 nanobody

Tabela 34 SEQ ID Números: 95 para 97 representa três humanizado 12A5 nanobodies. A Tabela V enumera as modificações aminoácidas que foram executadas para realizar essas seqüências. A figura 20 representa o alinhamento das seqüências humanizadas para 12A5.

25

Tabela V: não-limitação de substituições se humanizam:

--	--	--	--	--	--	--	--

	1E	23A	44G	73N	74A	83R	84A
1 2A5H1							
1 2A5H2							
1 2A5H3							

As expressões foram executadas conforme descrito acima no Exemplo 2. Os rendimentos de expressão depois da purificação de TALON são resumidos na Tabela 35 para cada um humanizado 12A5 nanobody.

A estabilidade do humanizado 12A5 nanobodies foi medida conforme descrito acima no Exemplo 7. O OD280 do supernadantes foi medido e expresso como a porcentagem do OD280 na temperatura ambiente. Os resultados são resumidos na Tabela 36. Todos humanizado 12A5 nanobodies é de maneira comparável estável para aquecer-se em temperaturas crescentes ao tipo natural.

O ELISA foi executado como descrito no Exemplo 3. A figura 21 ilustra a atividade de ligação para vWF em ELISA.

A afinidade dos humanizados 12A5 nanobodies para vWF foi determinada em BIACORE. Os valores de KD são resumidos na Tabela 37.

Exemplo 17: Bivalente humanizou nanobodies

Três humanizou nanobodies 12A2H1, 12A2H4 e 12B6H2 foram selecionados forma para bivalente com o 3a linker. As

seqüências desses 3 nanobodies diferenciam-se só por alguns aminoácidos como mostrado na Figura 22. Tabela 38 SEQ ID Número 98 a 100 listas as seqüências dos nanocorpos bivalente. Tabela 38 SEQ ID Número 101 - a 106 listas as 5 seqüências de nanobodies bivalente humanizado ligado com o GS9 e GS30 linker, respectivamente.

As expressões foram executadas como descrito no Exemplo 2. Os nanobodies conter (A sua) 6 etiqueta foram purificados em uma coluna de Nickel (TALON, Clonetech) como 10 descrito pelo fabricante. A seqüência de etiqueta é EQKLISEEDLNGAAHHHHHH. Os nanocorpos sem etiquetas foram purificados na proteína A. Os rendimentos de expressão foram calculados e são resumidos na Tabela 39.

A estabilidade dos nanocorpos bivalente humanizado foi 15 medida como descrito no Exemplo 7. O OD280 do supernadantes foi medido e expresso como a porcentagem do OD280 na temperatura ambiente. Os resultados são resumidos na Tabela 40.

Os nanobodies (tipo humanizado mas também natural) 20 foram testados na câmara de fluxo em uma concentração de 0.15 µg/ml, 0.3 tg/ml e 0.6 µg/ml. O mesmo doador foi usado para todos os experimentos. O experimento foi executado como descrito no Exemplo 4. A figura 23 mostra a adesão de plaqueta em concentrações diferentes de nanobodies 25 bivalente. Tabela 41 adesão de plaqueta de listas de tipo natural e nanobodies bivalente humanizado.

D. O efeito do Nanobody (bivalente) na trombose arterial em um babuíno FOLTS modela o Exemplo 18: o Babuíno FOLTS modela com ALX-0081

Neste estudo a eficácia e a segurança de ALX-0081 foram avaliadas em um modelo de trombose Folts em babuínos.

Também, a eficácia e a segurança de ALX-0081 em um modelo de trombose Folts em babuínos foram em comparação com outras fármacos atualmente usadas na clínica, como Reopro, Plavix, Aspegic, Heparina e Epinefrina. Todos esses foram diluídos no cloreto de sódio de 0.9% e administrados como injeções bolo intravenosas. Este estudo foi também projetado para determinar a dose eficaz para cada um desses compostos.

Finalmente, a eficácia em uma trombose Folts modelam em babuínos de uma combinação de fármacos que é atualmente usada na clínica em uma colocação de (PCI) de intervenção coronária percutânea foi testado: Aspegic, Heparina, e Plavix. Além disso avaliamos se ALX-0081 pode melhorar a eficácia desta combinação quando topo acrescentado.

Vimos parâmetros de segurança como a indução de hemorragia, vWF e fator VIII níveis, e contagem de plaqueta, PT, e aPTT.

Protocolo de Estudo

O protocolo de estudo que foi aplicado é o modelo de Folts original e algumas modificações descritas mais adiante (Folts JD, e al, Circulation. 1976; 54:365-370).

Babuínos masculinos ou femininos são (Papio ursinus) foram usados. Os animais tinham 8-17 kg de peso e foram sem

doença por pelo menos 2 semanas antes do uso. Os babuínos foram alimentados com comida seca padrão só. Os babuínos foram usados em pontos de tempo diferentes. O peso dos babuínos são resumidos na tabela 42 (estudo de eficácia ALX-0081 e comparação com fármacos individuais) e tabela 50 (eficácia de uma combinação de fármacos e ALX-0081 além desta combinação).

Os animais foram anestesiados e a temperatura de corpo é mantida a 37°C com uma mesa aquecida. Um segmento de uma artéria femoral foi dissecado livre do tecido circundante. Desvio foi colocado entre a veia femoral e artéria femoral para obter altas taxas de corte. O fluxo de sangue médio e fásico foi registrado continuamente em todas as partes do experimento. O fluxo de base foi registrado por 20 minutos. O sítio de dissecação proximal da artéria femoral então foi prejudicado aplicando duas oclusões de sobreposição da artéria por 1 segundo usando um fórceps. Uma braçadeira foi colocada por cima do sítio ferido para criar uma estenose externa.

Um declínio gradual no fluxo de sangue devido a adesão de plaqueta e agregação foi observado. Quando o fluxo foi reduzido ao zero, o fluxo de sangue foi restaurado abrindo a braçadeira para desalojar o trombo rico em plaquetas. Este modelo repetitivo do fluxo de sangue que diminui depois da restauração mecânica menciona-se como reduções de fluxo cíclicas (CFRs). O dano endotelial adicional foi repetido se necessário para obter finalmente CFRs estável nesses

babuínos. O número de vezes que o trombo tinha de ser desalojado determina o número de CFRs. A figura 24 ilustra o modelo de fluxo de sangue durante o modelo de Folts em babuínos.

5 Depois de um período de controle de 30 minutos de CFRs reprodutível, o veículo foi administrado como um controle interno e CFRs foram acompanhados por mais 30 minutos. Depois deste período, agentes de teste (salina (n=2), Reopro (n=3), Aspepic (n=3), Plavix (n=4), Heparina (n=3) ou ALX-
10 0081 Nanobody™ (n=9)) foram fornecidos via uma injeção de bolo intravenoso (seguido por uma infusão contínua para ALX-0081) e a monitorização foi continuada até 30 minutos depois da administração de fármaco. Este procedimento foi repetido para várias vezes com o escalamento de doses da substância
15 de teste. O efeito de anti-trombótico foi quantificado comparando o comprimento de CFRs antes e depois da administração de fármaco. Quando a inibição plena de CFRs foi observada, um novo dano foi aplicado para confirmar que a inibição foi um efeito do tratamento mas não de um
20 fenômeno de cura natural. No fim dos experimentos, Epinefrina (2.2 .tg/kg/min) foi injetada para distinguir-se entre uma inibição débil e uma forte do CFRs. De fato, foi demonstrado antes que CFRs reaparecem na presença de Epinefrina quando a aspirina (uma fármaco de anti-plaqueta
25 débil) é usada no mesmo modelo.

A organização do experimento é ilustrada na Figura 25.

Os comprimentos dos CFRs, depois de cada dose do

composto de teste são resumidos nas tabelas 43-48. As doses nas quais a inibição plena de CFRs é obtida são sombreadas.

Uma leitura representativa do fluxo de sangue durante os experimentos de modelo de Folts é mostrada nas figuras
5 26-31.

Os resultados demonstram que CFRs pode ser obtido nos animais de controle por pelo menos 3 horas, sem a necessidade para um novo dano no meio. O comprimento médio do CFRs é 2-5 minutos e não há nenhum efeito no comprimento
10 do CFRs pela injeção salina (figura 26, tabela 43).

Aspegic

Três animais foram injetados com Aspegic (Aspirina injetável) e procurada inibição de CFRs. Na clínica, uma
15 injeção de bolo de 250 mgs (f 3-5 mgs/kg) é administrada ao paciente, justo antes de começar um procedimento de intervenção coronária percutânea (PCI). Em dois animais (babuíno 3 e 5) nenhuma inibição de CFRs pode ser obtida em doses tão altas como 80 e Aspegic de 40 mgs/kg
20 respectivamente (figura 27, tabela 44). No babuíno 4, foi muito difícil estabelecer um modelo repetitivo estável de CFRs na fase de controle. Depois que vários novos danos foram feitos (isto é, no momento que injetamos a salina), CFRs estáveis foram obtidos. A inibição completa de CFRs foi
25 obtida na dose de Aspegic de 5 mgs/kg, mas em mais altas doses e sobre o novo dano, o CFRs devolvido, embora o comprimento médio do CFRs fosse 3-4 vezes mais longo do que

antes da administração de Aspegic. Depois de infusão de Epinefrina, o CFRs voltou imediata e completamente (tabela 44).

5 Heparina

Três animais foram injetados com Heparina não fracionada e procurados por inibição de CFRs. Na clínica, uma injeção de bolo de 60-70 IU/kg é administrada ao paciente, e o aPTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) é controlado a cada 30 minutos. Heparina extra é administrada se o aPTT for <250 segundos. Nos babuínos 7 e 8, nenhuma inibição do CFRs pode ser obtida mesmo em doses tão altas como 240 IU/kg (a figura 28, tabela 45). No babuíno 6, a inibição completa do CFRs foi obtida na primeira dose de 15 IU/kg e em mais altas doses, mas quando fizemos um novo dano o CFRs voltou cada vez. Na dose mais alta de 240 IU/kg, CFRs foram inibidos até depois de um novo dano, mas o fluxo diminuía e na infusão da Epinefrina, o CFRs retornava imediatamente.

20

Plavix

Quatro babuínos foram tratados com Plavix e usados para o estudo de Folts. Usamos Plavix como fármaco injetável re-suspendendo pastilhas no metanol. Por isso, fomos capazes de executar um experimento de escalamento de dose quanto a outros fármacos. Em pacientes, Plavix de 300-600 mgs é administrado oralmente, a inibição da agregação de plaqueta

pode ser vista 2 horas depois de doses orais únicas de Plavix. Já na dose final de 2.5 mgs/kg nos babuínos, um efeito no comprimento do CFRs pode ser demonstrado, mas este efeito inibitivo começou só 10 minutos depois da injeção (figura 29, tabela 46). No babuíno 12, a inibição completa do CFRs foi obtida nesta dose de 2,5 mgs/kg. Em outros três babuínos a inibição completa de CFRs foi obtida na dose final de 5 mgs/kg. O CFRs permaneceu inibido quando um novo dano foi feito, mas voltou depois da infusão de Epinefrina. Quando a infusão Epinefrina foi parada, o CFRs permaneceu por outros 5 minutos, mas então novamente a inibição completa foi obtida (a figura 29).

Reopro

O Reopro foi testado para eficácia no modelo de Folts em três babuínos. Na clínica, os pacientes recebem uma dose de 250 µg/kg seguido por uma infusão contínua de 7,5 µg/kg/hora. Isto é, também a dose da qual precisamos em babuínos 13, 14 e 15 para obter a inibição completa do CFRs (dose final de 170-420 gg/kg (a figura 30, tabela 47). Administramos aos babuínos uma injeção de bolo só. Quando um novo dano foi aplicado, a inibição completa do CFRs foi retida e a infusão de Epinefrina não pode inverter esta inibição (a figura 30).

25

Nove babuínos receberam ALX-0081 e foram usados no modelo de Folts. Em todos os babuínos a inibição completa de CFRs foi obtida na dose de 30 µg/kg + 45 µg/kg/hora (dose final de 43 µg/kg). Em 2 babuínos, a inibição completa já
5 foi obtida na 10 jig/quilograma + 15 gg/kg/hora (babuínos 17 e 22). A inibição foi retida sobre um novo dano e depois da infusão de Epinefrina nos nove babuínos (a figura 31, tabela 48).

Aspegic-Heparina-Plavix-ALX-0081 (Asp/Hep/Plav/ALX)
10 combinações

Sete babuínos receberam uma injeção de bolo de Aspirina de 5 mgs/kg, 60 IU/kg Heparina e doses crescentes de Plavix. Heparina extra foi administrada em pontos de tempo diferentes para segurar certo nível (aPTT deve ser
15 pelo menos dobrado contra o controle). Os CFRs foram controlados por 30 minutos depois de cada dose de compostos de teste. Começamos em uma dose de Plavix de 1 mg/quilograma e acrescentamos 1 mg/quilograma depois de 30 minutos. O efeito anti-trombótico foi quantificado comparando o
20 comprimento de CFRs antes e depois da administração de fármaco. Quando a inibição completa de CFRs foi observada, um novo dano foi aplicado. A Epinefrina foi injetada e continuada até o fim do experimento.

Se CFRs não voltava, um novo dano era aplicado. Depois
25 de 2-3 CFRs as doses crescentes de ALX0081 foram acrescentadas: (1), 3, 10 ou 30 pg/kg. Esperamos depois de cada dose de ALX-0081 para 2 CFRs e aumentamos a dose até

que a inibição completa de CFRs fosse obtida. Na inibição completa do CFRs, a infusão contínua foi começada de dose de 1,5 tempos ALX-0081/kg/hora para a 30 infusão de epinefrina e minutos foi continuada. Um novo dano foi aplicado depois de 10-15 minutos. As especificações dos babuínos que foram usados neste estudo são representadas na tabela 49.

Os resultados desses estudos para cada composto de teste individualmente são resumidos na tabela 50. Um efeito anti-trombótico superior claro no modelo de babuíno de trombose Folts é observado para ALX-0081 e Reopro quando em comparação com a Aspirina, Heparina ou Plavix: sobre o novo dano e depois da infusão de Epinefrina, os CFRs não voltam no modelo de Folts no ALX0081 e babuínos tratados com Reopro em contraste com o modelo em Aspepic, Heparina ou Plavix trataram animais. A dose de ALX-0081 requerida para inibição completa de CFRs é aproximadamente de 10 vezes mais baixa do que a dose necessária para Reopro. Por isso, é concluído que ALX-0081 é mais potente do que Reopro.

Depois da administração de uma combinação da Aspirina de 5 mgs/kg, 60 IU/kg Heparina e doses crescentes de Plavix, nos sete babuínos a inibição completa de CFRs foi obtida nesta dose final. A dose de Plavix requereu que a inibição plena seja de 2,5 vezes mais baixa do que a dose necessária quando Plavix sozinho é administrado. Para todos os babuínos testados, CFRs não voltou quando um novo dano foi feito (a figura 32). Contudo, com injeção de Epinefrina, CFRs retornava espontaneamente em babuínos 5, 8, 9 e 10 e sobre

um novo dano em babuínos 4, 6 e 7. Heparina extra foi injetada ao mesmo tempo como epinefrina. Depois de 2 CFRs, as doses crescentes de ALX0081 foram administradas continuando a infusão de Epinefrina. A dose de ALX-0081 foi aumentada de 1 mais de 3-10 a 30 µg/kg. Quando a inibição completa de CFRs foi obtida, uma infusão contínua de ALX-0081 foi começada em 1,5 vezes a dose/quilograma/hora eficaz. Nos sete babuínos, a inibição completa do CFRs foi obtida na 30 dose de gg/kg. Esta dose eficaz de ALX-0081 é a mesma requerida para a inibição completa de CFRs no modelo de Folts quando ALX-0081 é administrado sozinho.

Por isso, podemos concluir que a eficácia de ALX-0081 não é aumentada pela infusão simultânea de Plavix, Heparina e Aspegic. Esta observação corresponde completamente à nossa hipótese: o ALX-0081 inibe muito a primeira interação entre plaquetas e o colágeno exposto na parede arterial danificada. O Plavix e Aspegic por outro lado inibe o fluxo ulterior na cascata que leva ao desenvolvimento de um trombo. Por isso, Plavix e a Aspirina não contribuem para a melhor eficácia, dado que ALX-0081 interfere já no primeiro passo na formação do trombo. Além disso, quando um novo dano foi aplicado na dose eficaz de ALX-008 1, o CFRs não voltou, demonstrando um efeito antitrombótico potente deste Nanobody™. Os resultados são resumidos na tabela 51.

25

Medições

Os parâmetros seguintes foram medidos: a) análise de

sangramento, b) concentração de vWF, níveis de Fator VIII, e contagem de plaqueta, PT e aPTT c) agregação de plaqueta ristocetina-induzida d) ALX-0081 concentração, e análise e) de seções arteriais para restenose, f) imunogenicidade de
5 ALX-0081

a) Análise de hemorragia

Para analisar a hemorragia, uma incisão foi feita com um escalpelo na virilha. Isto foi feito 15 minutos depois de registrar fluxo de base, quando o dano foi feito na artéria.
10 A gaze foi inserida na ferida e substituída a cada 30 minutos justo antes de cada nova dose do composto de teste. A quantidade da perda de sangue depois de cada dose do composto de teste foi determinada pesando a gaze. A perda de
15 sangue é expressa quanto à quantidade da perda de sangue na segunda gaze de controle (durante a injeção salina) (tabelas 52-54).

Para todos os babuínos tratados com Plavix e Reopro, a perda de sangue é alta (até 9-40 vezes respectivamente na dose mais alta), começando da dose eficaz. Para os animais
20 tratados com ALX-0081 a hemorragia é mais baixa do que em animais tratados do Plavix, e muito mais baixa quando em comparação com animais tratados com Reopro.

Para determinar a segurança contra o nível de eficácia de Plavix, Reopro e ALX-0081 como fármacos antitrombóticos,
25 as médias da perda de sangue quanto à segunda gaze de controle são mostradas para esses fármacos em função da dose

de fármaco como múltiplo da dose eficaz (a figura 33). A dose eficaz para Plavix é 5 mgs/kg, para Reopro 250 tg/kg e para ALX-0081 30 µg/kg (tabela 46-48). Esses resultados agradavelmente demonstram a segurança superior de ALX-0081 quando em comparação com Reopro e Plavix: a janela na qual ALX-0081 pode ser administrado sem um aumento principal na hemorragia é muito mais larga em comparação com Plavix e Reopro.

Os resultados das médias da perda de sangue na gaze (se disponível) foram combinados com as médias dos comprimentos do CFRs nas figuras 34-36.

Uma larga janela terapêutica foi observada para ALX-0081 no modelo de Folts: um efeito antitrombótico forte pode ser demonstrado sem qualquer maior hemorragia para doses cumulativas nos limites de 43 .tg/kg até 403 µg/kg (a figura 36). Em contraste contudo, a janela terapêutica para Reopro e Plavix no mesmo modelo foi muito mais estreita em comparação com ALX0081, combinando um efeito de antitrombótico eficaz com uma alta perda de sangue (a figura 34-35).

A média da soma total da perda de sangue (= a soma da perda de sangue da gaze de cinco primeiras doses do composto de teste) como quanto à segunda gaze de controle é resumida na tabela 55. Nesta tabela também indicamos a dose final como múltiplo da dose eficaz (= a soma das cinco doses divididas pela dose eficaz). Como mencionado antes, a dose eficaz para Plavix é 5 mgs/kg, para Reopro 250 pg/kg e para

ALX-0081 30 pg/kg.

Os resultados mostrados na tabela 55 claramente demonstram que a perda de sangue total é significativamente aumentada nos animais tratados com Plavix e a uma extensão
5 mesmo mais alta nos animais tratados com Reopro. A perda de sangue em animais que recebem ALX-0081 é de 2 vezes e 4 vezes menos do que em Plavix ou em animais tratados com Reopro, respectivamente. Isto novamente claramente demonstra que ALX0081 está mais seguro do que Plavix e Reopro quanto a
10 risco de sangramento, embora doses de mais do que 10 vezes a dose eficaz fossem usadas.

A combinação eficaz de Aspegic, Heparina e Plavix resulta em um aumento na perda de sangue de até 14 vezes quando em comparação com a gaze de controle (tabela 56). A
15 adição de ALX0081 anteriormente da combinação de Aspegic, Heparina e Plavix não resulta em hemorragia aumentada exceto nos babuínos 4 e 7. No babuíno 7, a hemorragia foi muito aumentada depois da administração de epinefrina, extra heparina e não doses eficazes de ALX-0081, mas foi mais
20 baixa novamente depois da administração da dose eficaz de ALX-0081. Esses resultados demonstraram que ALX-0081 é seguro quando acrescentado anteriormente à combinação de fármacos que é atualmente usada em uma ambiente clínico.

25

b) Concentração de vWF, Fator VIII nível, contagem de plaqueta, PT e aPTT

vWF

Os níveis de vWF em plasma rico em plaquetas (PRP) de amostras de sangue tomado depois da administração das doses diferentes das fármacos no modelo de Folts foram determinados usando um ensaio de imunosorbente e expressos como uma porcentagem do padrão humano (QUEM 5 `h Padrão Internacional para fator VIII e VWF)

Os resultados claramente demonstram que os fármacos diferentes usados no modelo não têm nenhum efeito principal no nível de vWF.

Fator VIII

O fator que VIII níveis no PRP de amostras de sangue tomado depois da administração das doses diferentes dos fármacos no modelo de Folts foi determinado usando o teste de aPTT. Não testamos as amostras de plasma dos babuínos tratados com Heparina, como demonstramos que Heparina prolonga o tempo aPTT. Os níveis de FVIII foram expressos como a porcentagem da primeira amostra de controle, tomada 10 minutos depois do dano da artéria femoral. Não vemos nenhum efeito dos tratamentos no teste de aPTT.

Contagem de plaqueta, PT e aPTT

As medições de contagem de plaqueta durante os experimentos de modelo de Folts foram executadas. Os dados mostraram que o babuíno 15 tem uma contagem de plaqueta

muito baixa quando em comparação com outros animais. As contagens de plaquetas para toda espécie de tratamentos, exceto o tratamento Plavix, são muito comparáveis com o que vemos nos animais de controle e são regularmente constantes dentro de algum tempo.

Os valores de PT não demonstram nenhum efeito dos compostos de teste no tempo de PT, exceto babuínos tratados com a dose de 240 IU/kg de Heparina onde um aumento menor no PT foi observado.

Os valores de aPTT observados durante os estudos de modelo de Folts são resumidos. Esses resultados indicam que os compostos de teste não têm nenhum efeito nos valores de aPTT, exceto os babuínos tratados com Heparina. Nesses animais, valores de aPTT são prolongados da dose de 30-60 IU/kg em diante, como também é observado em pacientes. A Heparina atua como um anticoagulante formando um complexo com antitrombina e catalisando a inibição de fatores de coagulação de sangue ativados como XIa, IXa, Xa e trombina (fator IIa). Esses fatores estão todos implicados na cascata de coagulação intrínseca da qual a sua funcionalidade é medida no teste de aPTT.

c) A medição da agregação de plaqueta ristocetina-induzida no sangue obtido de babuínos tratados com ALX-0081

O sangue obtido de babuínos tratados com ALX-0081 foi analisado para a inibição da agregação de plaqueta. As agregações de plaqueta foram executadas em um sangue inteiro

Chronolog e Agregômetro ótico (Modelo 560CA, Chronolog, os EUA). O PRP foi preparado (colhido em citrato 0.38 mol/L), por centrifugação do sangue inteiro em 1200 rotações por minuto por 5 minutos. A fração superior que contém o PRP foi cuidadosamente retirada. A fração mais baixa foi além disso centrifugada a 3000 rotações por minuto por 10 minutos para preparar o plasma pobre em plaquetas (PPP). As plaquetas foram contadas em PRP e diluíram-se em PPP a uma concentração final de 200.000 plaquetas por microlitro. 3 mg/ml ristocetina (DAKO) foram acrescentados e a agregação foi medida.

A agregação de plaquetas ex-vivo é medida nas amostras de sangue tomadas durante o experimento de Folts nos babuínos tratados com ALX-0081. A agregação de plaqueta dependente de GPIIb-IIIa através de vWF é medida usando ristocetina como um modulador. O % de agregação é medido em cada ponto de tempo e em cada dose. A amostra de controle é tomada 10 minutos depois do dano arterial.

Os resultados do teste de RIPA são comparados com a inibição do CFRs para cada babuíno tratado com ALX-0081 (figura 37). Como mostrado na figura 37, uma relação inversa entre o RIPA e o comprimento do CFRs é observada. Além disso, esses resultados manifestam que a inibição completa no teste de RIPA é obtida em doses mais baixas do que a inibição completa de CFRs em babuínos 16, 18, 19 e 23. Para os babuínos 20, 21, 22 e 24 os resultados com RIPA se comparam muito bem com os resultados para a eficácia no

modelo de Folts.

d) Concentração de ALX-0081

As Microplacas de titragem são cobertas do rato anti-
5 myc policlônico durante a noite a 4°C em uma diluição de
1000 vezes. As chapas são lavadas com o PBS-TWEEN e
bloqueadas por 2 horas em RT com caseína de 1% de PSB. As
amostras são diluídas em uma microplaca de titragem não-
coberta no plasma de babuíno de referência de 25%. A curva
10 padrão está preparada diluindo o nanobody na mesma amostra
de plasma de babuíno de referência. As amostras são
aplicadas nas chapas cobertas com anti-myc e deixadas se
ligar por 2 horas em RT. As chapas são lavadas 5 vezes com o
PBS-TWEEN. Anti-vWF-HRP de coelho (DAKO) é aplicado em uma
15 diluição de 3000 vezes por uma hora em RT. Para medir OD405
nm, as amostras são lavadas 5 vezes com o PBS-TWEEN e
substrato ABTS/H202 é acrescentado.

Determinamos a concentração de ALX-0081 em amostras de
plasma tomadas 10 minutos depois de cada injeção de bolo. A
20 injeção de bolo foi imediatamente seguida por uma infusão
contínua. As concentrações (pg/ml) são resumidas na tabela
58.

Para todos os babuínos um nível crescente de ALX-0081
nas amostras de plasma foram medidos por ELISA depois do
25 escalamento de dose de ALX-0081. Para o babuíno 16, as
quantidades constantemente mais altas de ALX-0081 foram
determinadas na amostra de plasma tomada depois de dose de

10 µg/kg em comparação com a amostra tomada depois de 30
gg/kg. O nível de ALX-0081 naquela amostra é também
substancialmente mais alto do que o que é observado para
todos outros babuínos dado o mesmo horário de dosagem de
5 ALX-0081. Como os níveis de ALX-0081 para o babuíno 16
depois das mais altas doses está na linha das expectativas,
assumimos que uma anormalidade desconhecida durante a
amostragem de sangue acontece para este contas este valor
marginal.

10 A concentração de ALX-0081 para cada dose nos babuínos
diferentes é variável. Para a dose de 3 pg/kg, a
concentração percorre entre 0,03 e 0,14 µg/ml para 10 pg/kg
entre 0,18 e 1,23 pg/ml, para 30 pg/kg entre 0,51 e 1,14
pg/ml, para 90 pg/kg entre 1,38 e 6,77 µg/ml e para 270
15 pg/kg entre 4,03 e 35,14 pg/ml. Na figura 38, traçamos a
concentração de ALX-0081 no plasma contra o comprimento do
CFRs.

A concentração de ALX-0081 requereu que a inibição
total de CFRs esteja entre 0,3 e 0,5 Vg/ml, que está em
20 pleno acordo com a concentração requerida para inibir a
adesão de plaqueta a colágeno na câmara de fluxo em alta
taxa de corte, quando ALX-0081 é pregado no sangue humano.
Em azul (a figura 38, painel B) indicamos a variedade de
concentração de ALX-0081 onde a inibição começa (omitir a
25 dose de 10 Vg/kg no babuíno 16).

Quando traçamos a concentração de ALX-0081 contra a
quantidade relativa da perda de sangue da gaze, observamos

um aumento de mais do que 2 vezes na hemorragia em doses acima de 1 pg/ml (a figura 39). Um aumento de 10 vezes na perda de sangue foi observado quando a concentração ALX-0081 é 19 pg/ml, que é 40-60 vezes a concentração eficaz.

5

e) Análise de seções arteriais para restenose

Quatro semanas depois do tratamento da segunda artéria, as artérias são dissecadas livres do tecido circundante. A artéria é ligada no sítio superior e abaixo do dano endotelial inclusive o sítio onde o desvio foi colocado. Uma seção é retirada de 2 centímetros, cortada em uma parte mais baixa (local do desvio) e a parte superior (local estenosado e prejudicado) e armazenado em formaldeído a 10%. Os babuínos então são sacrificados por injeção de eutanásia. As artérias são marcadas segundo a origem e cortadas em anéis de 2 mm cada um. Os anéis são colocados em cassetes marcados convenientes para processamento de histologia. Os cassetes então são colocados durante a noite em um Processador VIP Tissue Tek automatizado seguindo o horário de processamento noturno como descrito em Bancroft (Bancroft, John D., Stevens Alan (1990). Teoria e Prática de Técnicas Histológicas. Terceira Edição).

10
15
20

Depois do processamento, as artérias são embutidas em blocos de cera de parafina marcados e esfriadas em uma chapa congelada. Os blocos de cera são cortados em série as seções do 4 micron cada um em um micrótomo rotativo. As seções são colhidas em slides de vidro e manchadas para avaliação

25

histológica. O método de Haematoxylin e Eosin, bem como o método de Verhoeff para manchas de fibras elásticas são executados em cada uma das artérias (Bancroft, John D., Stevens Alan (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Terceira Edição). Depois de manchar, os slides são desidratados, compensados, montados e etiquetados. A análise cega das seções é executada.

f) Análise de Imunogenicidade

A presença de imunoglobulinas ALX-0081 no plasma de três babuínos foi avaliada por dois métodos, respectivamente um método ELISA e um método baseado em SPR em Biacore. Os babuínos foram tratados por 8 semanas com o aumento de doses de ALX-0081 (começando de 10 µg/kg). Durante as referidas 8 semanas, nenhuma resposta imunogênica pode ser observada sobre a injeção de ALX-0081. A meia-vida de ALX-0081 percorreu entre 7 e 9 horas. Exemplo 20: Uso de vWF como um antídoto para ALX-0081

Apesar da segurança provada de ALX-0081 em babuínos, e o despejo rápido do Nanobody™, decidimos avaliar o uso de vWF como um antídoto para ALX-0081. Isto foi testado em um modelo de Folts em babuínos onde avaliamos se o efeito inibitório de ALX-0081 na formação trombo arterial pode ser invertido pela injeção de vWF.

O procedimento experimental seguiu o modelo de Folts original com as modificações como descrito no exemplo prévio 18.

Babuínos masculinos são (*Papio ursinus*) foram usados neste estudo. Os animais tinham 9-12 kg de peso e ficaram sem doença por pelo menos 2 semanas antes do uso. Os babuínos foram alimentados com a comida padrão seca só.

5 Três babuínos foram usados neste estudo, o comprimento do CFRs durante a fase de controle, depois de administração salina, ALX-0081 e vWF é resumido na tabela 59.

O fluxo de sangue como uma função do tempo para cada babuíno e experimento é mostrado na figura 40.

10 Nos três babuínos, a inibição completa de CFRs foi obtida com uma dose de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + 45 μ de g/kg/hora de ALX-0081, mesmo quando um novo dano foi aplicado, o CFRs não voltou. Sobre a injeção da primeira dose de vWF (250 IU), o fluxo gradualmente diminuiu, mas CFRs não voltou até que uma
15 dose extra de 250 IU de vWF fosse administrada. Este resultado demonstrou agradavelmente que a atividade de ALX-0081 pode ser invertida pela administração de vWF, e que, por isso, o vWF seria um bom antídoto para este Nanobody™

Portanto, outro aspecto da invenção refere-se ao uso
20 de vWF, de um fragmento conveniente disso, de DDAVP (desmopressinor) ou um fragmento conveniente disso, ou de uma composição farmacêutica que compreende algum do precedente, como um antídoto para complicações ou efeitos colaterais indesejados associados com o uso de um Nanobody,
25 proteína ou polipeptídeo contra vWF, especialmente um Nanobody, proteína ou polipeptídeo conforme descrito na presente.

Exemplo 21: Efeitos de ALX-0081 em adesão de plaqueta a célula endotelial derivada UIvWF e na atividade de ADAMTS-13

5 Este estudo serve como prova do conceito para o uso de ALX-0081 como um fármaco em pacientes TTP. As aspersões de plaquetas reconstituídas no plasma TTP (nenhum ADAMTS 13) são executadas em células endoteliais que segregam ULvWF, na ausência e presença de ALX-0081. Em um experimento separado
10 testamos se ALX-0081, que liga ao domínio de A1 de vWF, interfere na atividade de ADAMTS-13. ADAMTS-13 liga a e racha o domínio A2 de vWF.

As células Endoteliais foram obtidas de veias de cordão umbilical humanas pelo método de Maruyama
15 (Z.Zellforsch. Mikrosk. A4nat. 60:69; 1963). As células endoteliais foram ativadas com 100 μ M de histamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) por 15 minutos em temperatura ambiente antes dos experimentos de perfusão.

O sangue foi extraído de voluntários sãos que negaram
20 a ingestão da aspirina ou outros fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) pelos 10 dias precedentes em um décimo de volume de citrato de sódio 3.4%. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado do sangue inteiro por centrifugação (10 minutos em 200g na temperatura ambiente).
25 O PRP foi acidificado pela adição de um décimo de volume de ACD (2.5% trissódio citrato, ácido cítrico de 1.5%, e D-glicose de 2%), e as plaquetas foram giradas (500g, 15

minutos). A pílula de plaquetas foi re-suspensa em HEPES (N-2-hidroxyietilpiperazina-N '-2-etanesulfônico ácido)-Tyrode buffer (HEPES de 10 mm, NaCl de 137 mm, KCl de 2.68 mm, NaH₂PO₄ de 0.42 mm, MgCl₂ de 1.7 mm, D-glicose de 5 mm, pH 6.5). Prostaciclina (PGI₂, 10 ng/mL) foi acrescentada para prevenir a ativação de plaquetas durante o passo de lavagem subsequente. As plaquetas foram giradas e re-suspensas em um pequeno volume do buffer HEPES-Tyrode. Esta suspensão de plaqueta foi diluída no buffer HEPES em pH 7.4, ou no plasma TTP.

As aspersões foram executadas em uma câmara de perfusão de passo único como descrito anteriormente. O experimento foi seguido por vídeo-microscopia em tempo real.

Em um segundo tipo do experimento, as misturas de reação diferentes estiveram preparadas como resumido na tabela 60, contudo, sem a adição do construto A1A2A3. O construto A1A2A3 é um fragmento recombinante consistente em domínios A1, A2 e A3 de vWF. As misturas foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C depois que o fragmento A1A2A3 é acrescentado e a mistura é incubada em um banho de água durante a noite a 37°C. No dia seguinte um SDS-PAGE redutor é dirigido às amostras (12%, e usando como marcador os Precision Plus Protein Standard de BioRad) e manchada em Immobilon-FL (Millipore). A mancha foi bloqueada por 2 horas na temperatura ambiente com blockbuffer (1:1 Odyssey blockbuffer em 1xTBS pH=7,4) e incubado com anti-vWF de coelho policlônico (DAKO). Alexa Fluor 680 anti-coelho de

cabra foi usado para detecção. A exploração foi feita no ODYSSEY para descobrir os produtos de degradação.

Experimento de controle: ligação de plaquetas a ULvWF

Células endoteliais foram isoladas de cordão umbilical humano recentemente obtidas por digestão de colagenase do interior da veia umbilical. As células foram cultivadas na cultura de tecido como uma população homogênea. As células endotelial humanas cultivadas crescem como monocamadas de grandes células poligonais estreitamente opostas, e elas contêm inclusões citoplasmáticas (corpos de WeibelPalade). Estimuladas por histamina endotelial, células isoladas de cordão umbilical humano expressam Fator Von Willebrand (ULvWF) ultra-grande na sua superfície. A perfusão dessas células estimuladas com plaquetas de sangue isoladas, que são suspensas em buffer ou em plasma de um paciente com TTP adquirido, resulta na deposição de plaquetas para o ULvWF (8). Essas plaquetas ULvWF-aderidas aparecem como assim chamadas `cadeias, que são visíveis quando o experimento de perfusão é controlado pela microscopia de vídeo de tempo real (a figura 41).

Inibição por ALX-0081 para a geração de cadeias de plaquetas

As plaquetas foram re-suspensas no buffer ou no plasma TTP e as concentrações de ALX0081 usado neste experimento foram 0,2, 2 e 10 µg/ml. Estimuladas por histamina endotelial células isoladas de cordão umbilical humano são

perfundidas com essas suspensões de plaqueta conforme descrito acima.

A adição de ALX-0081 a plaquetas re-suspensas no buffer ou no plasma de um paciente TTP resulta em uma
5 inibição completa da formação de cadeia em todas as condições testadas (a figura 42). Os experimentos de perfusão foram executados em taxa de corte de 2.5 dyn/cm² por 4 minutos. Durante esta perfusão de 4 minutos pelo menos 20 campos microscópicos foram examinados, e na presença do
10 Nanobody™, nenhuma cadeia pode ser demonstrada em todas as condições testadas (a figura 42).

Rachadura de ULvWF por ADAMTS-13

O ADAMTS-13 reduz o tamanho de multímeros grandes e ultra-grandes VWF a formas menores especificamente rachando
15 a ligação de peptídeo Y842/M843 no VWF A2 domínio. Dois tipos de ensaios foram usados para avaliar o efeito de ALX-0081 na rachadura de ULvWF por ADAMTS-13: isto é, um ensaio de perfusão e um ensaio que observa a rachadura de um fragmento recombinante vWF.

20 Em um primeiro experimento, as cadeias foram geradas por uma perfusão de 4 minutos de plaquetas lavadas re-suspensas no buffer por cima de células endoteliais estimuladas por histamina. Posteriormente, as plaquetas não-aderidas foram tiradas ao lavar por uma perfusão de 4
25 minutos do buffer. Depois disto, o buffer foi perfundido por outros 4 minutos, seguidos por uma perfusão de 4 minutos de plasma normal juntado que contém ADAMTS-13. A separação das

cadeias de plaqueta foi observada depois da perfusão de plasma normal juntado (a figura 43). Mais de 95% das cadeias foram rachadas depois da perfusão de 4 minutos.

Em um seguinte experimento, as cadeias foram geradas por uma perfusão de 4 minutos de plaquetas lavadas re-suspensas no buffer por cima de células endoteliais estimulado por histamina e as plaquetas não-aderidas foram tiradas ao lavar por uma perfusão de 4 minutos do buffer como anteriormente. Depois disto, ALX-0081 (10 μ g/ml no buffer) foi perfundido por 4 minutos, seguidos por uma perfusão de 4 minutos de plasma normal juntado que contém ALX-0081 (10 μ g/ml = excesso de molar de 10 vezes por cima de vWF) e ADAMTS-13. Podemos demonstrar claramente a separação das cadeias de plaqueta e 95% das cadeias foram rachadas depois da perfusão de 4 minutos (a figura 44)

Esses resultados claramente demonstram que ALX-0081 não tem um efeito na rachadura de cadeias de ULvWF por ADAMTS-13.

Em um segundo ensaio, um fragmento recombinante que contém o domínio A1-A2-A3 de vWF foi misturado com o plasma de coletivo normal (NPP) que contém ADAMTS-13, resultando a rachadura proteolítica do fragmento que foi observado por uma análise de Western Blot. A atividade de ADAMTS-13 foi testada na ausência e presença de 10 μ g/ml ALX-0081. Como indicado na figura 45 ALX-0081 não tem nenhum efeito na rachadura do fragmento vWF (travessas 6-7-8).

Para demonstrar que a rachadura observada é específica

para ADAMTS-13, um experimento de controle na presença de EDTA foi executado, dado que EDTA inibe a atividade de ADAMTS-13. Como esperado, a presença de EDTA em NPP resultou na inibição da rachadura do fragmento (a figura 45lane 4).

5 Este experimento novamente comprova que ALX-0081 não tem nenhum efeito na atividade ADAMTS-13.

10 Tabela 8: listagem de seqüência de nanocorpos anti-vWF

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
12A5	60	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVATITS GGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGY RFNDYWGQGTQVTVSS
12B1	61	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYGMGWFQAPGKEREFVTSISW SGTYTAYSDNVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAQSRYSNY YDHDKYAYWGQGTQVTVSS
12B6	62	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSYPMGWFRQAPGKERDVVAISR TGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDG RVRTLPEYFVWGQGTQVTVSS
12D11	63	AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCTASERTTFSSYTLGWFRQAPGKEREFVGGIS WSGVSTDYAEFAKGRFTISRDAANTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAALGRYSN WRNIGQYDYWGQGTQVTVSS
12E3	64	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFNNGMGWFQAPGKEREFVTSISW SGSYTAYADNVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAQSRYSNY YDHDKYAYWGQGTQVTVSS
12C9	65	AVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGSIFSSSAMAWYRQASGKQRELVATITS GGRTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYDCNFVVDGKRAPW GQGTQVTVSS
14F8	66	AVQLVESGGGLVQAGESLRLSCTSSGRAFSYNTGWFRQAPGKEREFVAAISW SGGLTYADSVKGRFTISRDNKDMVYLMASLKPEDTAVYYCAANRRQKTQV MGERAYDYWGQGTQVTVSS

15 Tabela 9: rendimentos de expressão de nanocorpos anti-vWF

Nanobody	Rendimento (mg/l) depois de TALON
12A5	13
12B1	6
12B6	16

12D11	8
12E3	4
12C9	25
14F8	48

5

Tabela 10: adesão de plaqueta em câmara de perfusão de nanocorpos anti-vWF

Nanobody	Controle	% Adesão de plaquetas a 2 $\mu\text{g/ml}$
12A5	60 \pm 7	10 \pm 3
12B1	60 \pm 7	56 \pm 3
12B6	60 \pm 7	19 \pm 5
12D11	60 \pm 7	61 \pm 7
12E3	60 \pm 7	54 \pm 1
12C9	71 \pm 3	68 \pm 8
14F8	71 \pm 3	51 \pm 10

Tabela 11: listagem de seqüência de 12B6 e 12A5 homólogo nanobodies

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
12A5 homólogo seqüências		
12B4	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGLYRQAPGKQRELVATIT SGGSTNYADSVKGRFTISRDKGKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSY GYRFN DYWGQGTQVTVSS
12E8	68	AVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGLYRQAPGKQRELVATIT SGGSTNYADSVKGRFTISRDKGKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGDY GYRFN DYWGQGTQVTVSS
12A6	69	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVATIT SGGSTNYADSVKGRFTISRDKGKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCYANLKQGDY GYRFN DYWGQGTQVTVSS
12D8	70	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVATIT SGGSTNYADSVKGRFTISRDKGKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCYANLKQGDY GYRFNDYWGQGTQVTVSS
12B6 homólogo seqüências		
12A2	71	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCLASGRIFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAAIS RTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYVYLMNLLKPEDTAVYYCAAAGVRAE DGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12F2	72	QVKLVESGGGLVQAGGALRLSCLASGRIFSYNPMGWFRQAPGRERDVAAIS RTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYVYLMNLLKPEDTAVYYCAAAGVRAE DGRVRSPLPSEYTFWGQGTQVTVSS
14H10	73	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCLASGRIFSYNPMGWFRQAPGKERDVAAIS RTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLEMNNLKPDDTAVYYCAAAGVRAE DGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

10

15

Tabela 12: K-on Previsto, K-off e KD valores para nanobodies 12A5 homólogos

Nanobody	Koff (x10⁻³/s)	Kon (x 10⁶ 1/Ms)	KD (nM)
12A5	2.51	0.629	3.98
12B4	2.2	0.544	4.05
12E8	2.93	0.171	17.1
12A6	4.72	0.188	25.1
12D8	5.84	0.139	41.9

Tabela 13: K-on Previsto, K-off e KD valores para nanobodies 12B6 homólogos

Nanobody	Koff (x10⁻³/s)	Kon (x 10⁶ 1/Ms)	KD (nM)
12B6	5.97	2.55	2.33
12A2	3.49	1.11	3.13
12F2	4.04	6.41	6.3
14H10	3.97	6.84	5.81

5

10

Tabela 14: verdadeiro valor de KD de nanobodies 12B6, 12A2 e 12A5

Nanobody	Koff (x10⁻³/s)	Kon (x 10⁶ 1/Ms)	KD (nM)
12B6	10.03	2.28	4.5
12A2	9.9	2.24	4.4
12A5	3.3	1.22	2.7

15

Tabela 15: adesão de plaqueta em câmara de perfusão de nanobodies 12B6, 12A2 e 12A5

Nanobody	% Adesão de plaquetas			
	0 µg/ml	0.2 µg/ml	0.4 µg/ml	0.6 µg/ml
Controle	71 ± 3	-	-	-
12B6	-	59 ± 6	43 ± 7	27 ± 8
12A2	-	58 ± 8	40 ± 10	11 ± 8
12A5	-	50 ± 7	27 ± 10	2 ± 2

20

Tabela 16: Concentração de 12B6, 12A2 e 12A5 nanobodies depois de aquecer em temperaturas crescentes

Nanobody	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12B6	100	97	100	104	94	91	68
12A2	100	106	104	100	93	87	90
12A5	100	108	107	98	83	75	66

Tabela 17: listagem de seqüência de nanobodies bivalentes

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
12A2-3a-12A2	74	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGG ALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YTFWGQGTQVTVSS
12A2-GS9-12A2	75	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTY YPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPLSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2-GS30-12A2	76	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFR QAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALK PEGTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A5-3a-12A5	77	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNALKPEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC LASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISR DGPKNNTVYLQMNALKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTV SS
12A5-GS9-12A5	78	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNALKPEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGR FTISRDPKNTVYLQMNALKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQ GTQVTVSS
12A5-GS30-12A5	79	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNALKPEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQ RELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNALKPEDTAVY YCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12B6-3a-12B6	80	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGG ALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YNFWGQGTQVTVSS
12B6-GS9-12B6	81	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTY YARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPLSEYNFWGQGTQVTVSS
12B6-GS30-12B6	82	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFR QAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALK PEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS

Tabela 18: listagem de seqüência de seqüências de linkers

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
3a	83	AAA
GS9	84	GGGGSGGGG
GS30	85	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG

Tabela 19: rendimentos de expressão dos nanobodies bivalentes 12B6, 12A2 e 12A5

Nanobody	Rendimento (mg/l) after TALON ou outra purificação
12B6	16
12B6-3a-12B6	9
12B6-GS9-12B6	16
12B6-GS30-12B6	17
12A2	18
12A2-3a-12A2	45
12A2-GS9-12 ^a 2	22
12A2-GS30-12A2	11
12A5	13
12A5-3a-12A5	10
12A5-GS9-12 ^a 5	11
12A5-GS30-12A5	18

5

Tabela 20: Concentração de 12B6 nanobodies bivalentes depois de aquecer em temperaturas crescentes

Nanobody	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12B6	100	97	100	104	94	91	68
12B6-3a-12B6	100	103	96	87	9	8	6
12B6-GS9-12B6	100	103	94	88	19	8	7
12B6-GS30-12B6	100	100	100	98	46	14	11

10

Tabela 21: Concentração de 12A2 nanobodies bivalentes depois de aquecer em temperaturas crescentes

Nanobody	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12A2	100	106	104	100	93	87	90
12A2-3a-12A2	100	87	88	91	55	50	43
12A2-GS9-12A2	100	102	113	138	91	13	15
12A2-GS30-12A2	100	115	93	116	81	49	34

Tabela 22: Concentração de nanobodies 12A5 bivalentes depois de aquecer em temperaturas crescentes

Nanobody	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12A5	100	108	107	98	83	75	66
12A5-3a-12A5	100	101	114	29	6	4	6
12A5-GS9-12A5	100	104	115	32	13	14	10
12A5-GS30-12A5	100	104	87	7	6	35	21

5

Tabela 23: adesão de plaqueta em câmara de perfusão de nanobodies 12A2 bivalentes

Nanobody	% Adesão de plaquetas			
	0 µg/ml	0.1 µg/ml	0.2 µg/ml	0.4 µg/ml
Controle	81±5	-	-	-
12A2	-	78±2	72±6	61±8
12A2-3a-12A2	-	74±5	50±3	33±0
12A2-GS9-12A2	-	81±1	73±1	40±2
12A2-GS30-12A2	-	81±3	73±3	37±1

10

Tabela 24: listagem de seqüência dos nanobodies 12B6 humanizados

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
12B6H 1	86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYC AAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12B6H 2	87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYC AAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12B6H 3	88	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYC AAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12B6H 4	89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYC AAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS

Tabela 25: rendimentos de expressão de tipo nanobodies 12B6 natural e humanizado

Nanobody	Rendimento (mg/l) after TALON ou outra purificação
12B6	16
12B6H1	3

15

12B6H2	9
12B6H3	8
12B6H4	3

Tabela 26: Concentração de tipo nanobodies 12B6 natural e humanizado depois de aquecer em temperaturas crescentes

Nanobody	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12B6	100	97	100	104	94	91	68
12B6H1	100	101	100	97	45	58	54
12B6H2	100	97	96	96	83	46	53
12B6H3	100	101	98	97	74	73	65
12B6H4	100	101	100	93	41	66	54

5

10

Tabela 27: Valores de KD do tipo para nanobodies 12B6 natural e humanizado

Nanobody	KD (nM)
12B6	4.4
12B6H1	4.4
12B6H2	3.5
12B6H3	9
12B6H4	7.3

15 **Tabela 28:** listagem de seqüência dos nanobodies 12A2 humanizados

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
12A2H1	90	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREL VA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDN AKRMVY LQMNSLRAEDTAVY YCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2H3	91	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREL VA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDN AKNMVY LQMNSLRAEDTAVY YCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2H4	92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREL VA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDN AKRSVY LQMNSLRAEDTAVY YCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2H1 1	93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYNPMGWFRQAPGKGREL VA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDN AKRMVY LQMNSLRAEDTAVY

		YCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2H1 3	94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYNPMGWFRQAPGKGREL VAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVY YCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

Tabela 29: rendimentos de expressão de nanobodies 12A2 tipo natural e humanizado

Nanobody	Rendimento (mg/l) after TALON ou outra purificação
12A2	18
12A2H1	11
12A2H3	11
12A2H4	11
12A2H11	15
12A2H13	11

- 5 **Tabela 30:** Concentração de nanobodies 12A2 de tipo natural e humanizado depois de aquecer em temperaturas crescentes

Nanobody	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12A2	100	106	104	100	93	87	90
12A2H1	100	99	99	99	100	89	80
12A2H3	100	102	101	102	102	90	89
12A2H4	100	100	101	100	99	90	83
12A2H11	100	111	113	107	103	85	67
12A2H13	100	104	103	103	100	90	81

- 10 **Tabela 31:** adesão de plaqueta de nanobodies 12A2 de tipo natural e humanizado em câmara de perfusão em 0.7 e 1.5 ug/ml

Nanobody	% Adesão de plaquetas		
	0 µg/ml	0.7 µg/ml	1.5 µg/ml
Controle	73±4	-	-
12A2	-	36±3	34±5
12A2H1	-	49±1	47±3
12A2H3	-	62±4	63±1
12A2H4	-	55±1	54±1
12A2H11	-	57±1	52±1
12A2H13	-	67±4	67±4

Tabela 32: adesão de plaqueta de nanobodies 12A2 de tipo natural e humanizado em câmara de perfusão em 0.5, 1 e 2 ug/ml

Nanobody	% Adesão de plaquetas			
	0 µg/ml	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
Controle	72±1	-	-	-
12A2	-	33±10	35±11	10±10
12A2H1	-	40±9	43±3	38±5
12A2H4	-	61±1	57±1	46±5

5 **Tabela 33:** Valores de KD para nanobodies 12A2 tipo natural e humanizado

Nanobody	KD (nM)
12A2	3,1
12A2 H3	14,6
12A2 H11	10,6
12A2 H13	38,8

Tabela 34: listagem de seqüência dos nanobodies 12A5 humanizados

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
12A5H1	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRIFSI G AMGYRQAPGK GREL VATITSGGSTNYADPVKGRFTISR DGPKNTVYLQMN SLRAEDTAVYY CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12A5H2	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRIFSI G AMGYRQAPGK GREL VATITSGGSTNYADPVKGRFTISR DGA KNTVYLQMN SLRAEDTAVYY CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12A5H3	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRIFSI G AMGYRQAPGK GREL VATITSGGSTNYADPVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLRAEDTAVYY CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS

10

Tabela 35: rendimentos de expressão de nanobodies 12A5 tipo natural e humanizado

Nanobody	Rendimento (mg/l) after TALON
12A5	13
12A5H1	8
12A5H2	9

12A5H3	11
--------	----

Tabela 36: Concentração de nanobodies 12A5 de tipo natural e humanizado depois de aquecer em temperaturas crescentes

Nanobody	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12A5	108	107	98	83	75	66
12A5H1	99	91	86	60	69	63
12A5H2	99	108	90	58	67	60
12A5H3	101	97	97	67	73	64

5

Tabela 37: Valores de KD do nanobodies 12A5 tipo para natural e humanizado

Nanobody	KD (nM)
12A5	1,6
12A5H1	1,8
12A5H2	12,8
12A5H3	ND

10

Tabela 38: listagem de seqüência de nanobodies bivalente humanizado

Nome	SEQ ID NO	Seqüência
12A2H1-3a- 12A2H1	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGRELVA AISRTGGSTYYPDS VEGRFTISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAED GRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSSAAAEVQLVESGGGLVQP GGSLRLS CAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGRELVA AISRTGG STYYPDSVEGRFTISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEY TFWGQGTQVTVSS
12A2H4-3a- 12A2H4	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGRELVA AISRTGGSTYYPDS VEGRFTISRDN AKRSVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAED GRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSSAAAEVQLVESGGGLVQP GGSLRLS CAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGRELVA AISRTGG STYYPDSVEGRFTISRDN AKRSVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEY TFWGQGTQVTVSS
12B6H2-3a- 12B6H2	100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGREVVAAISRTGGSTYYARS VEGRFTISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAED GRVRTLPSEYNFWGQGTQ VTVSSAAAEVQLVESGGGLVQP GGSLRLS CAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGREVVAAISRTGG STYYARSVEGRFTISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEY NFWGQGTQVTVSS
12A2H1-GS9- 12A2H1	101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGRELVA AISRTGGSTYYPDS VEGRFTISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAED GRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQP GGSLRLS CAASGR TFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRF TISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDT AVYYCAAAGVRAEDGRVR TLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2H4-GS9- 12A2H4	102	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGRELVA AISRTGGSTYYPDS VEGRFTISRDN AKRSVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAED GRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQP GGSLRLS CAASGR TFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRF TISRDN AKRSVYLQ MNSLRAEDT AVYYCAAAGVRAEDGRVR TLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12B6H2-GS9- 12B6H2	103	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGREVVAAISRTGGSTYYARS VEGRFTISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAED GRVRTLPSEYNFWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQP GGSLRLS CAASGR TFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAA ISRTGGSTYYARSVEGRF TISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDT AVYYCAAAGVRAEDGRVR TLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12A2H1-GS30- 12A2H1	104	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGRELVA AISRTGGSTYYPDS VEGRFTISRDN AKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAED GRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQP GGSLRLS CAASGR TFSYNPMGWFRQAPGKGREL

		VAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRA EDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2H4-GS30- 12A2H4	105	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRSVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREL VAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRSVYLQMNSLRA EDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12B6H2-GS30- 12B6H2	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAP GKGREVVAAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRE VAAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRA EDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

Tabela 39: rendimentos de expressão de nanobodies bivalente humanizado

Nanobody	Tags	Rendimento (mg/l)
12A2H1-3a-12A2H1	Sim	5
12A2H1-3a-12A2H1	Não	6
12A2H4-3a-12A2H4	Sim	10
12A2H4-3a-12A2H4	Não	7
12B6H2-3a-12B6H2	Sim	10
12B6H2-3a-12B6H2	Não	2

Tabela 40: Concentração do Nanobody bivalente humanizado depois de aquecer em

5 temperaturas crescentes

Nanobody	Tags	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
12A2H1-3a-12A2H1	Sim	98	96	93	63	8	9
12A2H1-3a-12A2H1	Não	100	99	100	77	14	15
12A2H4-3a-12A2H4	Sim	100	99	95	9	6	9
12A2H4-3a-12A2H4	Não	98	98	98	18	17	26
12B6H2-3a-12B6H2	Sim	100	91	85	7	6	7
12B6H2-3a-12B6H2	Não	100	99	99	28	13	18

Tabela 41: adesão de plaqueta de tipo natural e nanobodies bivalente humanizado

Nanobody	% Adesão de plaquetas			
	0 µg/ml	0.15 µg/ml	0.3 µg/ml	0.6 µg/ml
Controle	65 ± 8	-	-	-
12B6-3a-12B6	-	50 ± 5	15 ± 6	8 ± 6
12B6H2-3a-12B6H2	-	53 ± 4	30 ± 16	17 ± 6
12A2-3a-12A2	-	36 ± 8	10 ± 8	4 ± 3
12A2H1-3a-12A2H1	-	54 ± 4	10 ± 11	12 ± 7

12A2H4-3a-12A2H4	-	38 ± 2	10 ± 6	8 ± 4
------------------	---	------------	------------	-----------

Tabela 42: babuínos usados com os diferentes compostos de teste no estudo de Folts

Babuino ID	Sex	Peso [kg]	Perna esquerda	Perna direita
1	mach o	9,8		Controle
2	mach o	10,0		Controle
13	mach o	12,4		Reopro
14	mach o	9,5		Reopro
15	mach o	10,8		Reopro
16	mach o		ALX-0081	
17	mach o	15,6		ALX-0081
18	mach o	17,2		ALX-0081
20/22	mach o	12,7	ALX-0081	ALX-0081
21	fêmea	8,0		ALX-0081
23	mach o			ALX-0081
24	mach o	9,4	ALX-0081	
3/19	mach o	15,2	Aspegic	ALX-0081
4	fêmea	13,6	Aspegic	
5	mach o	17,4	Aspegic	
9	mach o	13,2	Plavix	
6/10	mach o	10,2	Heparina	Plavix
7/11	mach o	9,4	Heparina	Plavix
8/12	mach o	10,5	Heparina	Plavix

5

Tabela 43: Comprimento de CFRs(s) para animais de controle (ND = não feito)

Controle	Babuino ID		
Final dose	Dose	1	2

0	controle	291	249
0	saline	294	278
0	saline	427	185
0	saline	285	203
0	saline	438	175

Tabela 44: Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com Aspegic™ (ND = não feito)

Aspegic		Babuino ID		
Final dose	Dose	3	4	5
0	controle	88	no CFRs	148
0	saline	147	204	184
1 mg/kg	1 mg/kg	149	164	135
2,5 mg/kg	1,5 mg/kg	102	325	115
5 mg/kg	2,5 mg/kg	102	1800	245
10 mg/kg	5 mg/kg	113	905	156
20 mg/kg	10 mg/kg	125	657	169
40 mg/kg	20mg/kg	110	ND	145
80 mg/kg	40mg/kg	129	ND	ND
Epinefrina		ND	161	ND

5

Tabela 45: Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com Heparina™ (ND = não feito)

Heparina		Babuino ID		
Final dose	Dose	6	7	8
0	controle	232	11 3	166
0	saline	298	13 1	246
15 IU/kg	15 IU/kg	630	20 8	255
30 IU/kg	30 IU/kg	355	24 1	320
60 IU/kg	60 IU/kg	432	24 6	332
120 IU/kg	120 IU/kg	610	16 0	206
240 IU/kg	240 IU/kg	>180 0	22 1	169
Epinefrina		109	65	ND

10

Tabela 46: o Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com Plavix™ (ND = não feito)

Plavix		Babuino ID			
Final dose	Dose	9	10	11	12
0	controle	215	178	84	144
0	saline	168	160	88	189
1 mg/kg	1 mg/kg	189	ND	132	179
2,5 mg/kg	2,5 mg/kg	883	400	258	>180 0
5 mg/kg	2,5 mg/kg	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0
10 mg/kg	5 mg/kg	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0
20 mg/kg	10 mg/kg	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0
Epinefrina		241	91	83	66

5

10

Tabela 47: o Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com Reopro™ (ND = não feito)

Reopro		Babuino ID		
Final dose	Dose	13	14	15
0	controle	144	90	308
0	saline	141	103	268
20 µg/kg	20 µg/kg	98	82	254
70 µg/kg	50 µg/kg	90	90	248
170 µg/kg	100 µg/kg	90	>180 0	>180 0
420 µg/kg	250 µg/kg	>180 0	>180 0	>180 0
920 µg/kg	500 µg/kg	>180 0	>180 0	>180 0
Epinefrina		>120 0	>120 0	>120 0

Tabela 48: o Comprimento de CFRs(s) para animais tratados com ALX-0081 (ND = não feito)

ALX-0081		Babuino ID								
Final dose	Dose	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	controle	168	293	185	90	94	117	188	164	161
0	saline	151	236	242	117	98	107	233	105	178
3 µg/kg	3 micro-gram/kg	193	ND	ND	144	133	183	312	112	295
13 µg/kg	10 micro-gram/kg	913	>1800	298	237	620	525	>1800	213	380
43 µg/kg	30 micro-gram/kg	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800
133 µg/kg	90 micro-gram/kg	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800
403 µg/kg	270 micro-gram/kg	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800
Epinefrina		>1200	>1200	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>900

5 Tabela 49: babuínos usados com diferentes compostos de teste no estudo de Folts

Babuino ID	Sex	Peso [kg]	Mix
1	Macho	9,8	Asp/Hep/Plav/ALX
2	Fêmea	13,6	Asp/Hep/Plav/ALX
3	Fêmea	7,8	Asp/Hep/Plav/ALX
4	Macho	12,1	Asp/Hep/Plav/ALX
5	Macho	11,4	Asp/Hep/Plav/ALX
6	Macho	11,4	Asp/Hep/Plav/ALX
7	Macho	14,0	Asp/Hep/Plav/ALX

10 Tabela 50: a Inibição de CFRs no Folts modela para as fármacos diferentes testadas. O número de experimentos nos quais uma inibição de CFRs foi observada nas condições diferentes mencionadas é mostrado como uma função do número total de repetições independentes daquela condição.

Composto de teste	Inibição de CFRs	Inibição de CFRs depois	Inibição de CFRs depois	Dose efetiva de
-------------------	------------------	-------------------------	-------------------------	-----------------

		de nova lesão	administração de Epinefrina	
Controle	0/2	ND	ND	-
Aspegic	0/3	0/3	0/1	-
Heparina	1/3	1/3	0/2	-
Plavix	4/4	4/4	0/4	5 mg/kg
Reopro	3/3	3/3	3/3	170-420 µg/kg
ALX-0081	9/9	9/9	9/9	13-43 µg/kg + 1,5 x dose/kg/hora

Tabela 51: Comprimento de CFRs (segundos) para cada babuíno e cada dose de Aspegic, Heparina, Plavix e ALX-0081. A dose eficaz é indicada em amarelo

	4	5	6	7	8	9	10
controle	82	99	109	95	113	142	113
saline	113	119	108	114	131	168	92
5 mg/kg Aspegic + 60 IU/kg Heparina + 1 mg/kg Plavix	153	135	272	742	146	219	223
+ 1 mg/kg Plavix	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0
Epinefrina + sem doses efetivas ALX-0081 + Heparina	250	72	87	95	106	105	105
Epinefrina + dose efetiva ALX-0081	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0	>180 0

5

Tabela 52: Perda de sangue quanto à segunda gaze de controle para animais tratados com Plavix™ em função da dose final (STD = desvio padrão)

Plavix	Dose	Babuino ID				Média	STD
		9	10	11	12		
Final dose	Dose						
1 mg/kg	1 mg/kg	0,6	1,3	1,6	1,2	1,4	0,2
2,5 mg/kg	1,5 mg/kg	1,5	1,4	1,1	1,0	1,2	0,2
5 mg/kg	2,5 mg/kg	5,1	4,7	1,4	6,6	4,5	2,2
10 mg/kg	5 mg/kg	6,5	4,5	5,8	13,6	7,6	4,1
20 mg/kg	10 mg/kg	3,7	4,1	9,1	2,6	4,9	2,9

10

Tabela 53: Perda de sangue quanto à segunda gaze de controle para animais tratados com Reopro™ em função da dose final (STD = desvio padrão)

Reopro	Dose	Babuino ID			Média	STD
		13	14	15		
Final dose	20 µg/kg	2,7	0,6	2,1	1,8	1
	20 µg/kg	2,7	0,6	2,1	1,8	1
	50 µg/kg	1,2	2,1	0,4	1,2	1
	50 µg/kg	1,2	2,1	0,4	1,2	1
	100 µg/kg	1,2	6,0	4,7	4,0	2
	100 µg/kg	1,2	6,0	4,7	4,0	2
	250 µg/kg	28,3	7,1	13,9	16,4	11
	250 µg/kg	28,3	7,1	13,9	16,4	11
	500 µg/kg	39,8	14,5	6,3	20,2	17
	500 µg/kg	39,8	14,5	6,3	20,2	17

5

Tabela 54: Perda de sangue quanto à segunda gaze de controle para animais tratados com a função de ALX-0081 in da dose final (STD = desvio padrão)

ALX-0081	Dose	Babuino ID								Média	STD
		17	18	19	20	21	22	23	24		
Final dose	3 µg/kg	ND	ND	0,4	1,2	0,5	1,1	1,8	0,8	1,0	0,5
	3 µg/kg	ND	ND	0,4	1,2	0,5	1,1	1,8	0,8	1,0	0,5
	10 µg/kg	1,2	0,8	0,1	1,2	1,1	1,3	1,1	1,1	1,0	0,4
	10 µg/kg	1,2	0,8	0,1	1,2	1,1	1,3	1,1	1,1	1,0	0,4
	30 µg/kg	2,8	2,0	4,1	3,9	2,1	3,8	3,0	1,6	2,9	1,0
	30 µg/kg	2,8	2,0	4,1	3,9	2,1	3,8	3,0	1,6	2,9	1,0
	90 µg/kg	2,5	3,1	2,0	0,4	4,0	5,3	5,6	1,4	3,0	1,8
	90 µg/kg	2,5	3,1	2,0	0,4	4,0	5,3	5,6	1,4	3,0	1,8
	270 µg/kg	2,6	2,3	2,3	0,4	0,8	5,6	10,7	0,9	3,2	3,4
	270 µg/kg	2,6	2,3	2,3	0,4	0,8	5,6	10,7	0,9	3,2	3,4

Tabela 55: Média da soma total de perda de sangue (= soma de perda de sangue de cinco primeiras doses de composto de teste) como quanto à segunda gaze de controle

Composto de teste	Dose total como múltiplo da dose efetiva	Média da perda de sangue total	Desvio padrão da perda de sangue
Plavix	4	19,4	4,0
Reopro	3,5	44	26
ALX-0081	13	10,8	5,7

10

Tabela 56: Perda de sangue na gaze quanto à segunda gaze de controle para cada babuíno tratado com Aspegic, Heparina, Plavix e ALX-0081 em função da dose de fármaco. A dose de fármaco eficaz na qual uma inibição completa de CFRs foi observada, é indicada em amarelo

	4	5	6	7	8	9	10	mediana±STD
5 mg/kg Aspegic + 60 IU/kg Heparina + 1 mg/kg Plavix	2,6	1	4,6	12,1	1,3	1,4	1,8	1,8 ± 3,5
+ 1 mg/kg Plavix	3,7	13,9	4,8	13,1	1,4	4,3	5,6	4,8 ± 6,7
Epinefrina + sem doses efetivas ALX-0081 + Heparina	9,4	2,7	2,7	67	0,3	4,8	9,2	4,8 ± 13,7
Epinefrina + dose efetiva ALX-0081	23,4	2,0	1	39,4	1,3	4,5	0,8	2,0 ± 10,3

Tabela 57: % agregação de plaqueta ristocetina-induzida para cada babuíno tratado com Aspegic, Heparina, Plavix e ALX-0081 em função da dose de fármaco

	4	5	6	7	8	9	10
controle	7 5	7 8	7 9	7 0	4 6	7 0	4 6
saline	4 8	7 8	7 4	2 4	4 5	6 5	4 7
5 mg/kg Aspegic + 60 IU/kg Heparina + 1 mg/kg Plavix	6 2	6 5	8 9	6 4	6 6	6 8	5 5
+ 1 mg/kg Plavix	4 2	6 3	6 6	8 3	5 9	7 6	6 0
Epinefrina + dose efetiva ALX-0081	0	2 4	2 4	6	1 7	7	8

Tabela 58: Concentração de ALX-0081 [µg/ml] em amostras de sangue obtidas em 10 minutos depois de administração

ALX-0081		Babuino ID								
Final dose	Dose	16	17	18	19	20	21	22	23	24
3 µg/kg	3 µg/kg	0,1 0			0,03	0,0 5	0,0 8	0,0 4	0,14	0,08
13 µg/kg	10 µg/kg	1,2 3	0,3 4	0,2 9	0,26	0,5 0	0,3 9	0,4 1	0,18	0,42
43 µg/kg	30 µg/kg	1,0 0	0,5 1	0,7 2	1,14	1,0 1	0,6 1	1,0 1	0,87	1,21
133 µg/kg	90 µg/kg	1,8 7	1,3 8	1,7 7	1,61	2,6 4	1,6 0	6,7 7	2,75	5,01
403 µg/kg	270 µg/kg	6,7 7	4,0 3	6,7 3	35,1 4	7,6 6	6,0 1	9,2 4	18,5 6	16,6 2

Tabela 59: Comprimento do CFRs [segundos] para babuínos tratados com ALX-0081 e com vWF

Dose	Babuino ID		
	1	2	3
Controle	119	140	111
Saline	ND	158	158
30 µg/kg + 45 µg/kg/hora ALX-0081	>180 0	>180 0	>180 0
250 IU vWF	>420	>180 0	>180 0
250 IU vWF	246	256	230

5

Tabela 60: Volumes [µl] para preparar as misturas diferentes para o estudo da rachadura de A1A2A3 por ADAMTS13

	NPP	NPP + EDTA	NPP + ALX-0081	PBS
Tris (100 mM)	5	5	5	5
BaCl ₂ (10 mM)	5	5	5	5
Pefablock (100 mM)	1.3	1.3	1.3	1.3
Plasma	3.3	3.3	3.3	3.3
ALX 0081 (2,48 mg/ml)	-	-	4	-
PBS	-	-	-	4
EDTA (0,35M) pH=8,3	-	2.6	-	-
H ₂ O	81.9	79.3	77.9	77.9
A1A2A3 (460 µg/ml)	3.5	3.5	3.5	3.5

10

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

5 <110> Ablynx N.V.

10 <120> Nanobodies Melhorado para o tratamento de desordens mediadas por agregação

<130> P05-003 PCT

15 <160> 303

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 26

<212> PRT

30 <213> Artificial

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

40 <223> X = Resíduo de Hallmark (vide tabela 2)

45 <400> 1

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

50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25

55 <210> 2

<211> 14
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (2)..(2)
15 <223> X = Resíduo de Hallmark

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (9)..(9)
25 <223> X = Resíduo de Hallmark

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (10)..(10)
35 <223> X = Resíduo de Hallmark

<220>
40 <221> misc_feature
<222> (12)..(12)
45 <223> X = Resíduo de Hallmark

<400> 2
50 Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val Ala
1 5 10

55 <210> 3

<211> 32
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (21)..(21)
15 <223> X = Resíduo de Hallmark

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (22)..(22)
25 <223> X = Resíduo de Hallmark

<400> 3
30 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

35 Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 4
40 <211> 11
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
55 <223> X = Resíduo de Hallmark

<220>

5 <221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> X = Residuo de Hallmark
10

<220>

15 <221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> X = Residuo de Hallmark
20

<400> 4

25 Xaa Xaa Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 5
30 <211> 26
<212> PRT
35 <213> Artificial

<400> 5

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

45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25

<210> 6
50 <211> 14
<212> PRT
55 <213> Artificial

<400> 6

5 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 7

10

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 7

20

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

25 <210> 8

<211> 13

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 8

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ala
1 5 10

40

<210> 9

<211> 14

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 9

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

55

<210> 10

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 10

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

15

<210> 11

<211> 13

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 11

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ala
1 5 10

30

<210> 12

35 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 12

45 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

50

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 13

55 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 13

10 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 14

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 14

25 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15

30

<211> 5

<212> PRT

35 <213> Artificial

<400> 15

40

Asn Tyr Gly Met Gly
1 5

45 <210> 16

<211> 5

<212> PRT

50

<213> Artificial

55 <400> 16

Ser Tyr Thr Leu Gly

1 5

5 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT

10 <213> Artificial

15 <400> 17
 Asn Tyr Asn Met Gly
 1 5

20 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT

25 <213> Artificial

30 <400> 18
 Ser Ser Ala Met Ala
 1 5

35 <210> 19
 <211> 5

40 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <400> 19
 Tyr Tyr Asn Thr Gly
 1 5

50 <210> 20
 <211> 5

55 <212> PRT

<213> Artificial

5 <400> 20

Ile Gly Ala Met Gly
1 5

10

<210> 21

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 21

Ile Gly Thr Met Gly
1 5

25

<210> 22

<211> 5

30

<212> PRT

<213> Artificial

35

<400> 22

Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

40

<210> 23

45 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 23

55 Ser Ile Ser Trp Ser Gly Thr Tyr Thr Ala Tyr Ser Asp Asn Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 24

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Artificial

15

<400> 24

Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
1 5 10 15

20

Gly

25

<210> 25

<211> 18

30

<212> PRT

<213> Artificial

35

<400> 25

Thr Ser Ile Ser Trp Ser Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Asp Asn Val
1 5 10 15

40

Lys Gly

45

<210> 26

<211> 17

50

<212> PRT

<213> Artificial

55

<400> 26

Ser Ile Ser Trp Ser Gly Met Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 Gly

<210> 27

10

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 27

20

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

25 <210> 28

<211> 17

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 28

Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

40

Gly

45 <210> 29

<211> 16

<212> PRT

50

<213> Artificial

55 <400> 29

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly

<210> 33

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 33

15 Gln Ser Arg Tyr Arg Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala
1 5 10 15

20 Tyr

<210> 34

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

30

<400> 34

35 Leu Gly Arg Tyr Arg Ser Asn Trp Arg Asn Ile Gly Gln Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

40 <210> 35

<211> 17

<212> PRT

45 <213> Artificial

<400> 35

50 Gln Ser Arg Tyr Ser Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala
1 5 10 15

55 Tyr

<210> 36
5 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
10
<400> 36
15 Ser Asn Arg Tyr Arg Thr His Thr Thr Gln Ala Met Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 37
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
25
<400> 37
30 Val Val Asp Gly Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 38
35 <211> 16
<212> PRT
40 <213> Artificial

<400> 38
45 Asn Arg Arg Gln Lys Thr Val Gln Met Gly Glu Arg Ala Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

50 <210> 39
<211> 14
<212> PRT
55 <213> Artificial

<400> 39

5 Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

<210> 40

10

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 40

20

Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 41

<211> 19

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 41

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

40

Tyr Asn Phe

45 <210> 42

<211> 19

<212> PRT

50

<213> Artificial

55 <400> 42

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu

<210> 46
5 <211> 5
<212> PRT
10 <213> Artificial

<400> 46
15 Ile Asn Leu Leu Gly
1 5

<210> 47
20 <211> 5
<212> PRT
25 <213> Artificial

<400> 47
30 Asn Tyr Trp Met Tyr
1 5

35 <210> 48
<211> 17
<212> PRT
40 <213> Artificial

<400> 48
45 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

50 Gly

55 <210> 49

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Artificial

<400> 49

10

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

15 <210> 50

<211> 16

<212> PRT

20

<213> Artificial

25 <400> 50

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

30

<210> 51

<211> 17

35 <212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 51

Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

45

Gly

50

<210> 52

<211> 17

55 <212> PRT

<213> Artificial

5 <400> 52

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10

Gly

15 <210> 53

<211> 17

<212> PRT

20

<213> Artificial

25 <400> 53

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

30

Gly

35 <210> 54

<211> 17

<212> PRT

40

<213> Artificial

45 <400> 54

Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

50

Gly

55 <210> 55

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Artificial

<400> 55

10

Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 56

<211> 6

<212> PRT

20

<213> Artificial

25 <400> 56

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

30

<210> 57

<211> 8

35 <212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 57

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
1 5

45

<210> 58

<211> 7

50

<212> PRT

<213> Artificial

55

<400> 58

Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser
1 5

5
<210> 59
<211> 5

10 <212> PRT
<213> Artificial

15
<400> 59

Gly Arg Gly Ser Pro
1 5

20
<210> 60
<211> 122

25 <212> PRT
<213> Artificial

30
<400> 60

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

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

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

45
Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

50 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

5 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61

10 <211> 126

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 61

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

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

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

35 Thr Ser Ile Ser Trp Ser Gly Thr Tyr Thr Ala Tyr Ser Asp Asn Val
50 55 60

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

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

50 Ala Ala Gln Ser Arg Tyr Arg Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys
100 105 110

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

<210> 62

55 <211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 62

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

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

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

25 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

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

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

40 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

45 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

50

<210> 63

<211> 126

55 <212> PRT

<213> Artificial

60

<400> 63

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

70

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Glu Arg Thr Thr Phe Ser Ser

20 25 30

5 Tyr Thr Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
35 40 45

10 Val Gly Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Glu Phe
50 55 60

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

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

25 Cys Ala Ala Leu Gly Arg Tyr Arg Ser Asn Trp Arg Asn Ile Gly Gln
100 105 110

30 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 64

30 <211> 126

<212> PRT

35 <213> Artificial

<400> 64

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

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

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

55 Thr Ser Ile Ser Trp Ser Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Asp Asn 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 Asp Ser Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
5

Ala Ala Gln Ser Arg Tyr Ser Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys
100 105 110
10

Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
15

<210> 65
<211> 116
<212> PRT
20
<213> Artificial

<400> 65
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
30

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Ser
20 25 30
35

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
40

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
45

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
50

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Asp Cys Asn
85 90 95
55

Phe Val Val Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110
55

Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 125
5 <212> PRT
<213> Artificial
10
<400> 66
15 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15
20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ser Ser Gly Arg Ala Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30
25 Asn Thr Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
30 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Met Val Tyr
65 70 75 80
40 Leu Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
45 Ala Ala Asn Arg Arg Gln Lys Thr Val Gln Met Gly Glu Arg Ala Tyr
100 105 110
50 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
55 <210> 67
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial
55 <400> 67

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

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

10 Ala Met Gly Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

15 Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

25 Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

30 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68

35 <211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 68

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

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

55 Ala Met Gly Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

	50		55		60														
5	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Gly	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu			
	65					70					75					80			
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Tyr			
10					85					90					95				
	Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Gly	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Phe	Asn	Asp	Tyr	Trp			
				100					105						110				
15	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115					120											
20	<210>	69																	
	<211>	122																	
	<212>	PRT																	
25	<213>	Artificial																	
30	<400>	69																	
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1				5					10					15				
35	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Gly			
				20					25					30					
40	Thr	Met	Gly	Leu	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val			
			35					40						45					
45	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys			
		50					55						60						
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Gly	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu			
50	65					70					75					80			
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Tyr			
					85					90					95				
55	Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Gly	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Phe	Asn	Asp	Tyr	Trp			
				100					105						110				

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

5

<210> 70

<211> 122

10

<212> PRT

<213> Artificial

15

<400> 70

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

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

Thr Met Gly Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

30

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

35

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

40

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

45

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

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

50

<210> 71

<211> 128

55

<212> PRT

<213> Artificial

5 <400> 71

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

40

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 72

40

<211> 128

<212> PRT

45 <213> Artificial

<400> 72

50

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

55

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

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

5
Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

10
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

15
Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

20
Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Ser Leu Pro
100 105 110

25
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

30
<210> 73
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

35
<400> 73

40
Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

55
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

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

5 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

10 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 74

15 <211> 259

<212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 74

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

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

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

40 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

50 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

55 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

130 135 140

5 Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

10 Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
165 170 175

15 Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
180 185 190

20 Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

25 Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

30 Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

35 Val Ser Ser

<210> 75

<211> 265

40 <212> PRT

<213> Artificial

45 <400> 75

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
5

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80
10

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
15

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110
20

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140
30

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160
35

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175
40

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190
45

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205
50

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys
210 215 220
55

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240
60

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
245 250 255
65

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 76
<211> 286
5 <212> PRT
<213> Artificial
10
<400> 76
15 Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
20 Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30
25 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
30 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50
35 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80
40 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
45 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110
50 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
55 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
60 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160
65 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

5 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala
195 200 205

10 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
210 215 220

15 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

20 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

25 Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

30 <210> 77
<211> 247
<212> PRT

35 <213> Artificial

40 <400> 77

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

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

50 Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

55 Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu

<400> 78

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30
10 Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
15 Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60
20 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
25 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95
Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110
30 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
35 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140
40 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe
145 150 155 160
45 Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg
165 170 175
Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
180 185 190
50 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr
195 200 205
55 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn
225 230 235 240

5 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250

10 <210> 79
<211> 274
<212> PRT

15 <213> Artificial

20 <400> 79
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

30 Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

35 Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

40 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

45 Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

50 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

55 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
145 150 155 160

5 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala
165 170 175

10 Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala
180 185 190

15 Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser
195 200 205

20 Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

25 Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225 230 235 240

30 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr
245 250 255

35 Ser Ser

<210> 80

<211> 259

40 <212> PRT

<213> Artificial

45 <400> 80

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

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val

<210> 81
5 <211> 265
<212> PRT
<213> Artificial
10
<400> 81
15 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
20 Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30
25 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val
35 40 45
30 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60
35 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80
40 Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
45 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110
50 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
55 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140
60 Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160
65 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

5 Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

10 Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys
210 215 220

15 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

20 Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly
245 250 255

25 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

30 <210> 82
<211> 286
<212> PRT
<213> Artificial

35 <400> 82

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

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

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

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

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

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

5 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

10 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

20 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

25 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
165 170 175

30 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

35 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala
195 200 205

40 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
210 215 220

45 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

50 Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

55 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

60 Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 83

65 <211> 3

<212> PRT
<213> Artificial
5
<400> 83
Ala Ala Ala
10 1
<210> 84
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
20
<400> 84
25 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 85
30 <211> 30
<212> PRT
35 <213> Artificial
<400> 85
40 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
45 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
<210> 86
50 <211> 128
<212> PRT
55 <213> Artificial

<400> 86

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

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

15 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val
35 40 45

20 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

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

30 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

40 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 87

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

45

<400> 87

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

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val

35 40 45

5 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

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

15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

20 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

25 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

30 <210> 88
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

35 <400> 88

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

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

50 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val
35 40 45

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

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

65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110
5

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

10 <210> 89
<211> 128

15 <212> PRT
<213> Artificial

20 <400> 89

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
25

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

30 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val
35 40 45

35 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
45

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

50 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

55 <210> 90

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Artificial

<400> 90

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

40

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

45

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 91

45 <211> 128

<212> PRT

50 <213> Artificial

<400> 91

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

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

5
Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

10
Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

15
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr
65 70 75 80

20
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

25
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

30 <210> 92
<211> 128
<212> PRT

35 <213> Artificial

40 <400> 92
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

45
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

50
Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

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

5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

10 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

15 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 93

<211> 128

20 <212> PRT

<213> Artificial

25 <400> 93

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

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

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

45 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

55 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

5 <210> 94
<211> 128
<212> PRT

10 <213> Artificial

15 <400> 94
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30
25 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45
30 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
35 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
45 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110
45 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

50 <210> 95
<211> 122
<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 95

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

35 <210> 96

<211> 122

<212> PRT

40 <213> Artificial

45 <400> 96

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30
55 Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

5
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

10
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

15
Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

20
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 97

<211> 122

25
<212> PRT

<213> Artificial

30
<400> 97

35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

40
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30

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

50
Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

50
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

55
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

5 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98

10 <211> 259

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 98

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

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

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

35 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

50 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

55 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe

<211> 259

<212> PRT

5 <213> Artificial

<400> 100

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

40

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

45

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

50

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

55

Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

5
Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

10 Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

15 Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

20
<210> 101
<211> 265
25 <212> PRT
<213> Artificial

30
<400> 101

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

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

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

45 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

55 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

5 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

15 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

20 Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

25 Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

30 Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
210 215 220

35 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
245 250 255

40 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

45 <210> 102
<211> 265
<212> PRT

50 <213> Artificial

55 <400> 102
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

5 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

10 Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

15 Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

20 Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
210 215 220

25 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

30 Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly
245 250 255

35 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 104

<211> 286

<212> PRT

40 <213> Artificial

<400> 104

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

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

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

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

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

10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

15 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

20 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

25 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

30 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

35 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala
195 200 205

40 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
210 215 220

45 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

50 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

55 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

275 280 285

5 <210> 105
<211> 286
<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 105

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

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

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

30 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

40 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

45 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

50 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

55 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190
5

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala
195 200 205
10

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
210 215 220
15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240
20

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255
25

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270
30

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285
35

<210> 106
<211> 286
<212> PRT
<213> Artificial
40

<400> 106
45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
50

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30
55

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val
35 40 45
60

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

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

5
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

10
Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

15
Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

20
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

25
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

30
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

35
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

40
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
210 215 220

45
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

50
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

55
Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 107
<211> 117
5 <212> PRT
<213> Artificial

10
<400> 107
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Gly Gly Gly
1 5 10 15
15 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp Leu Asn
20 25 30
20 Leu Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45
25 Ala Thr Cys Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu His Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
35 85 90 95
40 Lys Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
40 Val Thr Val Ser Ser
115
45 <210> 108
<211> 116
<212> PRT
50 <213> Artificial

55 <400> 108
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Glu Gly Gly

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

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

15 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

20 Val Ser Ser
115

<210> 110

<211> 116

<212> PRT

25 <213> Artificial

<400> 110

30 Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

60 Thr Ile Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

5
<210> 111
<211> 114

10 <212> PRT
<213> Artificial

15
<400> 111

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

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

25 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val
35 40 45

30 Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

45 Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

50 Ser Ser

50 <210> 112
<211> 114
<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 112

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

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

15 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

20 Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

30 Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35 Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

35

<210> 113

<211> 123

40

<212> PRT

<213> Artificial

45

<400> 113

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Ile

35 40 45

5 Ser Arg Asp Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

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

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

20 Cys Ala Lys Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 114
<211> 115
<212> PRT
30 <213> Artificial

35 <400> 114

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

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

50 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

5

Val Ser Ser
115

10

<210> 115

<211> 115

15

<212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 115

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

55

<210> 116

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Artificial

<400> 116

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 117

45 <211> 115

<212> PRT

50 <213> Artificial

<400> 117

55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

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

5 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

25 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

30 Val Ser Ser
115

<210> 118

<211> 115

<212> PRT

35 <213> Artificial

40 <400> 118

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

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

50 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

10 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

15 Val Ser Ser
115

<210> 119

<211> 115

20 <212> PRT

<213> Artificial

25 <400> 119

30 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

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

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

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

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

50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

55 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

5 <210> 120

<211> 115

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 120

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

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

25 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

40 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

45 Val Ser Ser
115

<210> 121

50 <211> 115

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 121

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

35

<210> 122

<211> 30

<212> PRT

40

<213> Artificial

45

<400> 122

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

50

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

55

<210> 123

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Artificial

<400> 123

10

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

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

<210> 124

20

<211> 30

<212> PRT

25 <213> Artificial

<400> 124

30

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

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

<210> 125

40

<211> 30

<212> PRT

45 <213> Artificial

<400> 125

50

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

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

<210> 126
<211> 30
5 <212> PRT
<213> Artificial
10
<400> 126
15 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn
20 20 25 30
<210> 127
<211> 30
25 <212> PRT
<213> Artificial
30
<400> 127
35 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ile Phe Ser
40 20 25 30
<210> 128
<211> 30
45 <212> PRT
<213> Artificial
50
<400> 128
55 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15

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

5 <210> 129

<211> 30

<212> PRT

10

<213> Artificial

15 <400> 129

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

20

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

25 <210> 130

<211> 30

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 130

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

40

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

45 <210> 131

<211> 30

<212> PRT

50

<213> Artificial

55 <400> 131

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

<210> 132

10 <211> 30

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 132

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

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

<210> 133

30 <211> 30

<212> PRT

35 <213> Artificial

<400> 133

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

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

<210> 134

50 <211> 30

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 134

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

5

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

10

<210> 135

<211> 30

15

<212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 135

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

25

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

30

<210> 136

<211> 30

35

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 136

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

45

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

50

<210> 137

<211> 30

55

<212> PRT

<213> Artificial

5 <400> 137

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

10

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

15 <210> 138

<211> 30

<212> PRT

20

<213> Artificial

25 <400> 138

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

30

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

35 <210> 139

<211> 30

<212> PRT

40

<213> Artificial

45 <400> 139

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

50

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

55 <210> 140

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Artificial

<400> 140

10

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

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

<210> 141

20

<211> 30

<212> PRT

25 <213> Artificial

<400> 141

30

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

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

<210> 142

40

<211> 30

<212> PRT

45 <213> Artificial

<400> 142

50

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

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

<210> 143
<211> 30
5 <212> PRT
<213> Artificial
10
<400> 143
15 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 20 25 30
<210> 144
<211> 30
25 <212> PRT
<213> Artificial
30
<400> 144
35 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
40 20 25 30
<210> 145
<211> 30
45 <212> PRT
<213> Artificial
50
<400> 145
55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

5 <210> 146

<211> 30

<212> PRT

10

<213> Artificial

15 <400> 146

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

20

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

25 <210> 147

<211> 30

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 147

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

40

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

45 <210> 148

<211> 5

<212> PRT

50

<213> Artificial

55 <400> 148

Ile Gly Ala Met Gly

<213> Artificial

5 <400> 152

Asn Tyr Gly Met Gly
1 5

10

<210> 153

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 153

Ser Ser Ala Met Ala
1 5

25

<210> 154

<211> 5

30

<212> PRT

<213> Artificial

35

<400> 154

Tyr Tyr Asn Thr Gly
40 1 5

<210> 155

45 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 155

Ile Gly Ala Met Gly
55 1 5

5 <210> 156
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

10
<400> 156
Ile Gly Ala Met Gly
15 1 5

20 <210> 157
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

25
<400> 157
Ile Gly Thr Met Gly
30 1 5

35 <210> 158
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

40
<400> 158
Ile Gly Thr Met Gly
45 1 5

50 <210> 159
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

55

<400> 159

5 Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

<210> 160

10

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 160

20

Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

25 <210> 161

<211> 5

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 161

Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

40

<210> 162

<211> 5

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 162

Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

55

<210> 163
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Artificial

10
<400> 163
Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

15
<210> 164
<211> 5
20 <212> PRT
<213> Artificial

25
<400> 164
Tyr Asn Pro Met Gly
30 1 5

<210> 165
35 <211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

40
<400> 165
45 Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

<210> 166
50 <211> 5
<212> PRT
55 <213> Artificial

<400> 166

5 Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

<210> 167

10 <211> 5

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 167

20 Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

25 <210> 168

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Artificial

35 <400> 168

Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

40 <210> 169

<211> 5

45 <212> PRT

<213> Artificial

50 <400> 169

Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

55

<210> 170
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Artificial

10
<400> 170
Tyr Asn Pro Met Gly
1 5
15
<210> 171
<211> 5
20 <212> PRT
<213> Artificial

25
<400> 171
Ile Gly Ala Met Gly
30 1 5

<210> 172
35 <211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
40

<400> 172
45 Ile Gly Ala Met Gly
1 5

<210> 173
50 <211> 5
<212> PRT
55 <213> Artificial

<400> 173

5 Ile Gly Ala Met Gly
1 5

<210> 174

10

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 174

20

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 175

25

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Artificial

<400> 175

35

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Thr
1 5 10

<210> 176

40

<211> 14

<212> PRT

45

<213> Artificial

<400> 176

50

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala
1 5 10

55

<210> 177

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 177

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Gly
1 5 10

15

<210> 178

<211> 14

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 178

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Thr
1 5 10

30

<210> 179

35 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 179

Trp Tyr Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

45

<210> 180

50

<211> 14

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 180

5 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 181

10

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 181

20

Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

25 <210> 182

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 182

Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

40

<210> 183

<211> 14

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 183

Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

55

<210> 184

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 184

Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

15

<210> 185

<211> 14

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 185

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala
1 5 10

30

<210> 186

35

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 186

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Asp Val Val Ala
1 5 10

45

<210> 187

50

<211> 14

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 187

5 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala
1 5 10

<210> 188

10

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 188

20

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val Ala
1 5 10

25 <210> 189

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 189

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala
1 5 10

40

<210> 190

<211> 14

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 190

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val Ala
1 5 10

55

<210> 191

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 191

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val Ala
1 5 10

15

<210> 192

<211> 14

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 192

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

30

<210> 193

35

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 193

45 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

50

<210> 194

<211> 14

<212> PRT

55

<213> Artificial

<400> 194

5 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 195

10

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 195

20

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 196

25

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Artificial

<400> 196

35

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 197

40

<211> 14

<212> PRT

45

<213> Artificial

<400> 197

50

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

55

<210> 198

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 198

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

15

<210> 199

<211> 14

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 199

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

30

<210> 200

35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 200

45 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
1 5 10 15

50

<210> 201

<211> 17

<212> PRT

55

<213> Artificial

<400> 201

5 Ser Ile Ser Trp Ser Gly Thr Tyr Thr Ala Tyr Ser Asp Asn Val Lys
1 5 10 15

10 Gly

<210> 202

15 <211> 17

<212> PRT

20 <213> Artificial

<400> 202

25 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu
1 5 10 15

30 Gly

<210> 203

35 <211> 17

<212> PRT

40 <213> Artificial

<400> 203

45 Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
1 5 10 15

50 Gly

<210> 204

55 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 204

10 Ser Ile Ser Trp Ser Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Asp Asn Val Lys
1 5 10 15

Gly

15

<210> 205

<211> 16

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 205

30 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 206

35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 206

45 Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

50

<210> 207

55

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 207

10 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 208

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 208

25 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 209

30

<211> 16

<212> PRT

35 <213> Artificial

<400> 209

40

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

45 <210> 210

<211> 16

<212> PRT

50

<213> Artificial

55 <400> 210

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

Gly

5

<210> 214

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Artificial

15

<400> 214

20 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

25

<210> 215

<211> 17

30

<212> PRT

<213> Artificial

35

<400> 215

40 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

45

<210> 216

<211> 17

50

<212> PRT

<213> Artificial

55

<400> 216

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu
1 5 10 15

5

Gly

10 <210> 217

<211> 17

<212> PRT

15

<213> Artificial

20 <400> 217

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu
1 5 10 15

25

Gly

30 <210> 218

<211> 17

<212> PRT

35

<213> Artificial

40 <400> 218

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

45

Gly

50 <210> 219

<211> 17

<212> PRT

55

<213> Artificial

<400> 219

5 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

10 Gly

<210> 220

15 <211> 17

<212> PRT

20 <213> Artificial

<400> 220

25 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

30 Gly

<210> 221

35 <211> 17

<212> PRT

40 <213> Artificial

<400> 221

45 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

50 Gly

<210> 222

55 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 222

10 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

15

<210> 223

<211> 16

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 223

30 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 224

35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 224

45 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 225

50

<211> 16

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 225

5 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 226

10

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 226

20

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

25 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
20 25 30

<210> 227

30

<211> 32

<212> PRT

35 <213> Artificial

<400> 227

40

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

45 Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 228

50

<211> 32

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 228

5 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
10 Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 229

15 <211> 32

<212> PRT

20 <213> Artificial

<400> 229

25 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp His Ala Ala Asn Thr Val Tyr Leu Glu
1 5 10 15
30 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 230

35 <211> 32

<212> PRT

40 <213> Artificial

<400> 230

45 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
50 Met Asp Ser Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 231

55 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 231

10 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

15 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Asp Cys Asn Phe
20 25 30

<210> 232

<211> 32

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 232

30 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

35 Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 233

<211> 32

40

<212> PRT

<213> Artificial

45

<400> 233

50 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

55 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
20 25 30

<210> 234

<211> 32

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 234

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
20 25 30

20

<210> 235

<211> 32

25 <212> PRT

<213> Artificial

30

<400> 235

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

35

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
20 25 30

40

<210> 236

<211> 32

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 236

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

55

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala

20

25

30

5 <210> 237

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 237

15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

20 Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

25 <210> 238

<211> 32

<212> PRT

30 <213> Artificial

<400> 238

35

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

40 Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

45 <210> 239

<211> 32

<212> PRT

50 <213> Artificial

<400> 239

55

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30
5
<210> 240
<211> 32
10
<212> PRT
<213> Artificial
15
<400> 240
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
20
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30
25
<210> 241
<211> 32
30
<212> PRT
<213> Artificial
35
<400> 241
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
40
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30
45
<210> 242
<211> 32
50
<212> PRT
<213> Artificial
55
<400> 242

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

5

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

10 <210> 243

<211> 32

<212> PRT

15

<213> Artificial

20 <400> 243

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

25

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

30 <210> 244

<211> 32

<212> PRT

35

<213> Artificial

40 <400> 244

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

45

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

50 <210> 245

<211> 32

<212> PRT

55

<213> Artificial

<400> 245

5 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

10 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 246

15 <211> 32

<212> PRT

20 <213> Artificial

<400> 246

25 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

30 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 247

35 <211> 32

<212> PRT

40 <213> Artificial

<400> 247

45 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

50 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 248

55 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 248

10 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

15 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

15

<210> 249

<211> 32

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 249

30 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

35 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
20 25 30

35

<210> 250

<211> 32

40

<212> PRT

<213> Artificial

45

<400> 250

50 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

55 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
20 25 30

55

<210> 251

<211> 32

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 251

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
20 25 30

20

<210> 252

<211> 14

25

<212> PRT

<213> Artificial

30

<400> 252

Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

35

<210> 253

<211> 17

40

<212> PRT

<213> Artificial

45

<400> 253

Gln Ser Arg Tyr Arg Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala
1 5 10 15

50

Tyr

55

<210> 254

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 254

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

15

Tyr Asn Phe

20

<210> 255

<211> 16

25 <212> PRT

<213> Artificial

30

<400> 255

Leu Gly Arg Tyr Arg Ser Asn Trp Arg Asn Ile Gly Gln Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

35

<210> 256

<211> 17

40 <212> PRT

<213> Artificial

45

<400> 256

Gln Ser Arg Tyr Ser Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala
1 5 10 15

50

Tyr

55

<210> 257

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 257

Val Val Asp Gly Lys Arg Ala Pro
1 5

15

<210> 258

<211> 16

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 258

Asn Arg Arg Gln Lys Thr Val Gln Met Gly Glu Arg Ala Tyr Asp Tyr
30 1 5 10 15

<210> 259

35 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 259

Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
45 1 5 10

<210> 260

50

<211> 14

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 260

5 Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

<210> 261

10

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 261

20

Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 262

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 262

Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

40

<210> 263

<211> 19

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 263

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

55

Tyr Thr Phe

5 <210> 264

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 264

15

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

20 Tyr Thr Phe

<210> 265

25

<211> 19

<212> PRT

30 <213> Artificial

<400> 265

35

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

40 Tyr Thr Phe

<210> 266

45

<211> 19

<212> PRT

50 <213> Artificial

<400> 266

55

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

Tyr Asn Phe

5

<210> 267

<211> 19

10

<212> PRT

<213> Artificial

15

<400> 267

20 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
1 5 10 15

Tyr Asn Phe

25

<210> 268

<211> 19

30

<212> PRT

<213> Artificial

35

<400> 268

40 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
1 5 10 15

Tyr Asn Phe

45

<210> 269

<211> 19

50

<212> PRT

<213> Artificial

55

<400> 269

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

5
Tyr Asn Phe

10 <210> 270

<211> 19

<212> PRT

15
<213> Artificial

20 <400> 270

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

25
Tyr Thr Phe

30 <210> 271

<211> 19

<212> PRT

35
<213> Artificial

40 <400> 271

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

45
Tyr Thr Phe

50 <210> 272

<211> 19

<212> PRT

55
<213> Artificial

<400> 272

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

10 Tyr Thr Phe

<210> 273

15 <211> 19

<212> PRT

20 <213> Artificial

<400> 273

25 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
1 5 10 15

30 Tyr Thr Phe

<210> 274

35 <211> 19

<212> PRT

40 <213> Artificial

<400> 274

45 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
1 5 10 15

50 Tyr Thr Phe

<210> 275

55 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 275

10 Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

<210> 276

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 276

25 Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

<210> 277

30

<211> 14

<212> PRT

35 <213> Artificial

<400> 277

40

Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 278

<211> 11

<212> PRT

50

<213> Artificial

55 <400> 278

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

5 <210> 279

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 279

15 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

20 <210> 280

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Artificial

30 <400> 280

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

35 <210> 281

<211> 11

40 <212> PRT

<213> Artificial

45 <400> 281

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

50 <210> 282

<211> 11

55 <212> PRT

<213> Artificial

5 <400> 282

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

10

<210> 283

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Artificial

20

<400> 283

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25

<210> 284

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Artificial

35

<400> 284

40 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 285

45 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 285

55 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 286
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
10
<400> 286
15 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 287
20 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
25
<400> 287
30 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 288
35 <211> 11
<212> PRT
40 <213> Artificial
<400> 288
45 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
50 <210> 289
<211> 11
<212> PRT
55 <213> Artificial

<400> 289

5 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 290

10

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 290

20

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25 <210> 291

<211> 11

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 291

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40

<210> 292

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 292

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

55

<210> 293

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 293

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

15

<210> 294

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 294

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30

<210> 295

35 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 295

45 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

50

<210> 296

<211> 11

<212> PRT

55 <213> Artificial

<400> 296

5 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 297

10

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Artificial

<400> 297

20

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25 <210> 298

<211> 11

<212> PRT

30

<213> Artificial

35 <400> 298

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40

<210> 299

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Artificial

50

<400> 299

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

55

<210> 300

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

10

<400> 300

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

15

<210> 301

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 301

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30

<210> 302

35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

40

<400> 302

45

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

50

<210> 303

<211> 11

<212> PRT

55

<213> Artificial

<400> 303

5 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

10

REIVINDICAÇÕES

1. Nanocorpo contra Fator de Von Willebrand (vWF), o referido nanocorpo composto de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), é CARACTERIZADO pelo fato de que:

i) CDR1 compreende, essencialmente compõe-se de, ou é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

10	NYGMG	[SEQ ID n. 15]
	SYTLG	[SEQ ID n. 16]
	NYNMG	[SEQ ID n. 17]
	SSAMA	[SEQ ID n. 18]
	YYNTG	[SEQ ID n. 19]
15	IGAMG	[SEQ ID n. 20]
	IGTMG	[SEQ ID n. 21]
	YNPMG	[SEQ ID n. 22]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só

contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

ii) O CDR2 compreende, essencialmente compõe-se de ou é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

	SISWSGTYTAYSDNVKG	[SEQ ID n. 23]
20	GISWSGVSTDYAEFAKG	[SEQ ID n. 24]
	TSISWSGSYTAYADNVKG	[SEQ lo n. 25]
	S1SWSGMSTYYTDSVKG	[SEQ ID n. 26]
	TITSGGRTSYADSVKG	[SEQ lo n. 27]
	AISWSGGLTYADSVKG	[SEQ ID n. 28]
25	TITSGGSTNYADPVKG	[SEQ ID n. 29]
	TITSGGSTNYADSVKG	[SEQ lo n. 30]
	AISRTGGSTYYARSVEG	[SEQ ID n. 31]

A1SRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID n. 32]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e em que:

iii) O CDR3 compreende, essencialmente compõe-se

de ou é uma seqüência aminoácida escolhida do grupo composto de :

	QSRYRSNYYDHDDKYAY	[SEQ ID n. 33]
	LGRYRSNWRNIGQYDY	[SEQ ID n. 34]
5	QSRYSSNYYDHDDKYAY	[SEQ ID n. 35]
	SNRYRTHTTQAMYNY	[SEQ ID n. 36]
	VVDGKRAP	[SEQ ID n. 37]
	NRRQKTVMGERAYDY	[SEQ ID n. 38]
	NLKQGSYGYRFNDY	[SEQ ID n. 39]
10	NLKQGDYGYRFNDY	[SEQ ID n. 40]
	AGVRAEDGRVRTLPSEYNF	[SEQ ID n. 41]
	AGVRAEDGRVRTLPSEYTF	[SEQ ID n. 42]
	AGVRAEDGRVRSVPSEYTF	[SEQ ID n. 43]

ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que têm
 15 pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas; em que

20 (1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou
 25 inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas;

e/ou do grupo composto de seqüências aminoácidas que

têm 3, 2 ou só 1 "diferença(s) aminoácida(s)" (conforme definido na presente) com uma das seqüências aminoácidas acima mencionadas, em que:

(1) qualquer substituição aminoácida é preferivelmente uma substituição aminoácida conservadora (conforme definido na presente); e/ou

(2) a referida seqüência aminoácida preferivelmente só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

2. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO por ter uma variante humanizada.

3. Nanocorpo contra Fator Von Willebrand (vWF), o referido nanocorpo composto de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam complementaridade (CDR I a CDR3 respectivamente), CARACTERIZADO pelo fato de que:

g) CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se de

- a seqüência aminoácida YNPMG; ou

umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com a seqüência aminoácida YNPMG;

e

h) CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se de

- a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; ou

- uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade

de seqüência de 99% com a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; ou

- umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com

5 a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG;

e

i) CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se de

- a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

- uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%,
10 preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99%

com a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

- umas seqüências aminoácidas que tem só I
15 diferença aminoácida com o

seqüência de aminoácido AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

4. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR1 compreende ou essencialmente se compõe da seqüência aminoácida YNPMG.

20 5. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR2 compreende ou essencialmente se compõe da seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG

25 6. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR3 compreende ou essencialmente se compõe da seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

7. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADO pelo fato de que:

- O CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

O CDR1 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; ou

- O CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; e o CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

8. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR1 compreende ou essencialmente se compõe da seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

9. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR1 compreende ou essencialmente se compõe da seqüência aminoácida YNPMG; o CDR2 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida que AISRTGGSTYYPDSVEG e CDR3 compreendem ou essencialmente se compõem da seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

10. Nanocorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 9, CARACTERIZADO pelo fato de que

- qualquer substituição aminoácida é uma substituição aminoácida conservadora; e/ou

a referida seqüência aminoácida só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

11. Nanocorpo contra Fator Von Willebrand (vWF), o referido Nanocorpo composto de 4 regiões de armação (FR1 a FR4 respectivamente) e 3 regiões que determinam complementaridade (CDR1 a CDR3 respectivamente), CARACTERIZADO pelo fato de que:

a) O CDR1 é:

- a seqüência aminoácida YNPMG; ou
- umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1 diferença aminoácida com a seqüência aminoácida YNPMG;

e

b) O CDR2 é:

- a seqüência aminoácida AISRTGGSTIYPDSVEG; ou
- uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com a seqüência aminoácida AISRTGGSTIYPDSVEG; ou umas seqüências aminoácidas que tem 2 ou só 1 diferença(s) aminoácida(s) com a seqüência

aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG;

e

c) O CDR3 é:

- a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

5 - uma seqüência aminoácida que tem pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mesmo mais preferivelmente pelo menos identidade de seqüência de 99% com a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

10 - umas seqüências aminoácidas que tem só 1 diferença aminoácida com a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

12. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 11, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR1 é a seqüência aminoácida
15 YNPMG.

13. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 11, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR2 é a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG

14. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 11,
20 CARACTERIZADO pelo fato de que CDR3 é a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

15. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 11, CARACTERIZADO pelo fato de que:

- O CDR1 é a seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 é
25 a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; ou

- O CDR1 é a seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR2 compreende a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; ou

- O CDR2 é a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG; e o CDR3 compreende a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

16. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 11, na qual CDR1 é a seqüência aminoácida YNPMG; e o CDR3 compreende ou essencialmente compõe-se da seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

17. Nanocorpo, de acordo com a reivindicação 11, CARACTERIZADO pelo fato de que CDR1 é a seqüência aminoácida YNPMG; o CDR2 é a seqüência aminoácida AISRTGGSTYYPDSVEG e CDR3 é a seqüência aminoácida AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

18. Nanocorpo, de acordo qualquer uma das reivindicações de 11 a 16, CARACTERIZADO pelo fato de que

- qualquer substituição aminoácida é uma substituição aminoácida conservadora; e/ou

- a referida seqüência aminoácida só contém substituições aminoácidas, e nenhuma eliminação ou inserções aminoácidas, em comparação com as seqüência(s) aminoácida(s) acima mencionadas.

19. Nanocorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 18, CARACTERIZADO pelo fato de que é um nanocorpo de classe KERE.

20. Nanocorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 18, CARACTERIZADO por ter a variante humanizada.

21. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou

identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com pelo menos um dos nanocorpos do grupo composto de SEQ ID NO's 60-73 e SEQ ID NO's 86-97.

22. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de que tem pelo
5 menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou
identidade de seqüência pelo menos de 99% com pelo menos um
dos nanocorpos 12136 (SEQ ID n. 62); 12A2 (SEQ ID n. 71);
12F2 (SEQ ID n. 72); 14H10 (SEQ ID n. 73); 12B6H1 (SEQ ID n.
86); 12B6H2 (SEQ ID n. 87); 12B6H3 (SEQ ID n. 88); 12B6H4
10 (SEQ ID n. 89); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n.
91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e/ou
12A2H13 (SEQ ID n. 94).

23. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de que tem pelo
menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou
15 identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido
na presente) com pelo menos um dos nanocorpos 12A2 (SEQ ID
n. 71); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4
(SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H13 (SEQ ID
n. 94).

20 24. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de que tem pelo
menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou
identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido
na presente) com nanocorpo 12A2H1 (SEQ ID n. 90).

25 25. Nanocorpo, de acordo com qualquer uma das
reivindicações de 20 a 24, CARACTERIZADO por ter a variante
humanizada.

26. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de ser

escolhido do grupo composto dos nanocorpos da SEQ ID NO's 6073 e SEQ ID NO's 86-97.

27. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de ser escolhido do grupo composto dos nanocorpos 12B6 (SEQ ID n. 62); 12A2 (SEQ ID n. 71); 12F2 (SEQ ID n. 72); 14H10 (SEQ ID n. 73); 12B6H1 (SEQ ID n. 86); 12B6H2 (SEQ ID n. 87); 12B6H3 (SEQ ID n. 88); 12B6H4 (SEQ ID n. 89); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H1I (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

28. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de ser escolhido do grupo composto dos nanocorpos 12A2 (SEQ ID n. 71); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H1 I (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

29. Nanocorpo, CARACTERIZADO pelo fato de ser 12A2H1 (SEQ ID NO:90).

30. Proteína ou polipeptídeo, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende ou essencialmente se compõe do nanocorpo, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

31. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 30, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende ou essencialmente se compõe de pelo menos um nanocorpo, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

32. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 31, CARACTERIZADOS por compreender pelo menos dois nanocorpos definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

33. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 31, CARACTERIZADOS por compreender dois nanocorpos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

5 34. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 33, CARACTERIZADOS pelo fato de que os nanocorpos ou nanocorpo presentes na proteína ou polipeptídeo é nanocorpos são conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 3 a 20.

10 35. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 33, CARACTERIZADOS pelo fato de que os nanocorpos ou nanocorpo presentes na proteína ou polipeptídeo são nanocorpos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 22 a 29.

15 36. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 33, CARACTERIZADOS pelo fato de que os nanocorpos ou nanocorpo presentes na proteína ou polipeptídeo são nanocorpos conforme definido na reivindicação 24.

20 37. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 33, CARACTERIZADOS pelo fato de que os nanocorpos ou nanocorpo presentes na proteína ou polipeptídeo são escolhidos do grupo composto dos nanocorpos 12B6 (SEQ ID n. 62); 12A2 (SEQ ID n. 71); 12F2 (SEQ ID n. 25 72); 14H10 (SEQ ID n. 73); 12B6H1 (SEQ ID n. 86); 12B6H2 (SEQ ID n. 87); 12B6H3 (SEQ ID n. 88); 12B6H4 (SEQ ID n. 89); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4

(SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

38. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 33, CARACTERIZADOS pelo fato de que os nanocorpos ou nanocorpo presentes na proteína ou polipeptídeo são escolhidos do grupo composto dos nanocorpos 12A2 (SEQ ID n. 71); 12A2H1 (SEQ ID n. 90); 12A2H3 (SEQ ID n. 91); 12A2H4 (SEQ ID n. 92); 12A2H11 (SEQ ID n. 93) e/ou 12A2H13 (SEQ ID n. 94).

39. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 33, CARACTERIZADOS pelo fato de que os nanocorpos ou nanocorpo presentes na proteína ou polipeptídeo é um nanocorpo 12A2H1 (SEQ ID NO:90).

40. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 39, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende dois nanocorpos ou pelo menos dois nanocorpos, e onde os referidos referidos dois ou pelo menos dois nanocorpos são diretamente ligados um a outro ou ligados um a outro via um linker.

41. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 40, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende dois nanocorpos ou pelo menos dois nanocorpos, e onde os referidos referidos dois nanocorpos ou pelo menos dois nanocorpos são ligados um a outro via um linker.

42. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 41, CARACTERIZADOS pelo fato de que o linker é uma seqüência aminoácida.

43. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, CARACTERIZADOS pelo fato de que o linker compreendem entre 1 e 40 resíduos aminoácidos, como entre 2 e 30 resíduos aminoácidos.

5 44. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 43, CARACTERIZADOS pelo fato de que o linker compreende ou essencialmente se compõe de glicina e resíduos de serina.

10 45. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 44, CARACTERIZADOS pelo fato de que o linker compreende o linker GS9 (SEQ ID n. 84).

46. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 41, CARACTERIZADOS pelo fato de que o linker compreende ou essencialmente se compõe de resíduos alanina.

15 47. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, CARACTERIZADOS pelo fato de que o linker compreende entre 1 e 10 resíduos aminoácidos, como 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos aminoácidos.

20 48. Proteína ou polipeptídeo, CARACTERIZADOS pelo fato de que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com pelo menos um dos polipeptídios do grupo composto de SEQ ID NÚMEROS: 74-82 ou SEQ ID NÚMEROS 98-106.

25 49. Proteína ou polipeptídeo, CARACTERIZADOS pelo fato de que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme

definido na presente) com pelo menos um dos polipeptídios do grupo composto de SEQ ID NÚMEROS: 74-76, SEQ ID NO's 80-82 ou SEQ ID NÚMEROS 98-106.

5 50. Proteína ou polipeptídio, CARACTERIZADOS pelo fato de que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com pelo menos um dos polipeptídios do grupo composto de SEQ ID NÚMEROS: 74-76 e NÚMEROS ID SEQ: 98, 99, 101, 102, 104, 105 e 106.

10 51. Proteína ou polipeptídio, CARACTERIZADOS pelo fato de que tem pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou identidade de seqüência pelo menos de 99% (conforme definido na presente) com os polipeptídios de SEQ ID n. 90

15 52. Polipeptídio, CARACTERIZADOS pelo fato de que é da SEQ ID n. 90.

53. Fragmento de nanocorpo, CARACTERIZADO por ser definido de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

20 54. Fragmento de nanocorpo, CARACTERIZADO por ser definido de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 20.

55. Fragmento de nanocorpo, CARACTERIZADO por ser definido de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 29.

25 56. Fragmento de nanocorpo, CARACTERIZADO por ser definido de acordo com a reivindicação 24.

57. Fragmento de nanocorpo, CARACTERIZADO por ser

definido de acordo com qualquer uma das reivindicações de 27 a 29.

58. Fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 53 a 57, CARACTERIZADOS pelo fato de que tem um grau de identidade de seqüência de pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, como pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95%, com a seqüência aminoácida do correspondente nanocorpo de comprimento completo.

10 59. Proteína ou polipeptídeo, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende ou essencialmente se compõe de um fragmento segundo alguma das reivindicações 53-58.

60. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 59, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende ou essencialmente se compõe de pelo menos um fragmento conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 53 a 58.

61. Proteína ou polipeptídeo segundo alguma das reivindicações 59 ou 60, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende pelo menos dois fragmentos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 53 a 58.

62. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 59-61, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende dois nanocorpos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

63. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 59-62, CARACTERIZADOS pelo fato de

que compreende dois fragmentos ou pelo menos dois fragmentos, e onde os referidos dois fragmentos ou pelo menos dois fragmentos são diretamente ligados um a outro ou ligados um a outro via um linker.

5 64. Proteína ou polipeptídeo, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende ou essencialmente se compõe do nanocorpo que essencialmente não inibe a rachadura de ULvWF por ADAMTS-13.

10 65. Proteína ou polipeptídeo de acordo com a reivindicação 59, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende ou essencialmente se compõe de pelo menos um nanocorpo que essencialmente não inibe a rachadura de ULvWF por ADAMTS-13.

15 66. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 59 ou 60, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende pelo menos dois nanocorpos que essencialmente não inibem a rachadura de ULvWF por ADAMTS-13.

20 67. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 59 a 61, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende dois nanocorpos que essencialmente não inibem a rachadura de ULvWF por ADAMTS-13.

25 68. Proteína ou polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 64 a 68, CARACTERIZADOS pelo fato de que compreende dois fragmentos ou pelo menos dois fragmentos, e onde os referidos dois fragmentos ou pelo menos dois fragmentos são diretamente ligados um a outro ou ligados um a outro via um linker.

69. Seqüência de nucleotídeos ou ácido nucléico,

CARACTERIZADOS pelo fato de codificar nanocorpo, proteína, polipeptídio ou fragmento segundo qualquer uma das reivindicações precedentes.

5 70. Célula hospedeira, CARACTERIZADA por compreender uma seqüência de nucleotídeos ou ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 64, ou que expressa ou é capaz de expressar nanocorpo, a proteína, o polipeptídio ou o fragmento segundo qualquer uma das reivindicações de 1 a 68.

10 71. Método para preparar nanocorpo, proteína, polipeptídio ou fragmento de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 68, CARACTERIZADO pelo fato de que compreende a cultura ou a manutenção de uma célula hospedeira segundo a reivindicação 65 em condições tais que
15 a referida célula hospedeira produz ou expressa nanocorpo, a proteína, o polipeptídio ou o fragmento segundo alguma de reivindicações de 1 a 68; e que opcionalmente além disso compreende a isolação do nanocorpo, proteína, polipeptídio ou fragmento segundo alguma de reivindicações 1-68.

20 72. Composição farmacêutica, CARACTERIZADA pelo fato de compreender pelo menos um nanocorpo, proteína, polipeptídio ou fragmento segundo alguma de reivindicações 1-68, e opcionalmente pelo menos uma transportadora farmacêuticamente aceitável.

25 73. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 72, ou o nanocorpo, proteína, polipeptídio ou fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações de

1 a 73, CARACTERIZADOS pelo fato de servir para a prevenção ou tratamento de uma doença ou desordem relacionada à agregação mediada por plaqueta.

74. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 73, ou nanocorpo, proteína, polipeptídio ou fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 73, CARACTERIZADOS pelo fato de servir para a prevenção ou tratamento da doença ou desordem relacionada a agregação mediada por plaqueta, escolhida de trombo não-oclusivo, a formação de um trombo oclusivo, formação trombo arterial, oclusão coronária aguda, doença oclusiva arterial periférica, restenose e desordens que resultam de enxerto de desvio coronário, substituição de válvula de artéria coronária e intervenções coronárias tais como angioplastia, stenting ou aterectomia, hiperplasia depois angioplastia, aterectomia ou stenting arterial, síndrome oclusiva em um sistema vascular ou falta de revelação de artérias de doente, púrpura trombótica trombocitopénica (TTP), ataque de isquemia cerebral transiente, angina pectoris estável ou instável, enfarte cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomia carótida , estenose da artéria carótida, isquemia do limbo crítico, cardioembolismo, doença vascular periférica, restenose e enfarte do miocárdio.

75. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 73, CARACTERIZADA por adicionalmente conter uma ou várias outras substâncias ativas para a prevenção ou o tratamento de desordens mediadas por agregação, como

asperina (Aspegic), heparina, Plavix® e/ou Reopro®

76. Uso do nanocorpo, proteína, polipeptídeo ou fragmento, de acordo com as reivindicações de 1 a 68, CARACTERIZADO por ser utilizado na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença ou desordem relacionada à agregação mediada por plaqueta.

77. Uso do nanocorpo, proteína, polipeptídeo ou fragmento, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 68, CARACTERIZADO por ser utilizado na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença ou desordem relacionada à agregação mediada por plaqueta, escolhida de trombo não-oclusivo, a formação de um trombo oclusivo, formação trombo arterial, oclusão coronária aguda, doença oclusiva arterial periférica, restenose e desordens que resultam de enxerto de desvio coronário, substituição de válvula de artéria coronária e intervenções coronárias tais como angioplastia, stenting ou aterectomia, hiperplasia depois angioplastia, aterectomia ou stenting arterial, síndrome oclusiva em um sistema vascular ou falta de revelação de artérias de doente, púrpura trombótica trombocitopénica (TTP), ataque de isquemia cerebral transiente, angina pectoris estável ou instável, enfarte cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomia carótida, estenose da artéria carótida, isquemia do limbo crítico, cardioembolismo, doença vascular periférica, restenose e enfarte do miocárdio.

78. Uso de vWF, CARACTERIZADO pelo fato de ser

utilizado de um fragmento conveniente disso, de DDAVP (desmopressinor) ou um fragmento conveniente disso, ou de uma composição farmacêutica que compreende algum do precedente, como na antídoto para complicações ou efeitos colaterais indesejados associou-se com o uso do nanocorpo, proteína ou polipeptídeo contra vWF, especialmente do nanocorpo, proteína ou polipeptídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 68.

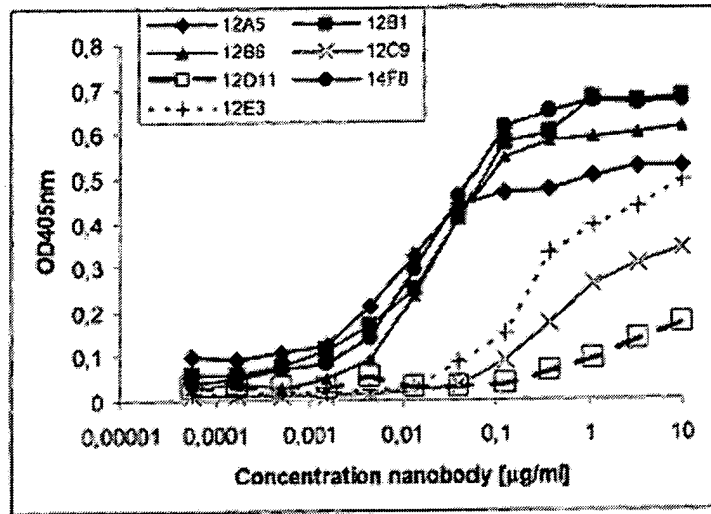


Figura 1

12A5 AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGANGMYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYAD
 12B4 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGANGLYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYAD
 12E8 AVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGANGLYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYAD
 12A6 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYAD
 12D8 AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYAD

 12A5 FVKGRFTISRDCPKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
 12B4 SVKGRFTISRDCPKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
 12E8 SVKGRFTISRDCAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGDYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
 12A6 SVKGRFTISRDCAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
 12D8 SVKGRFTISRDCAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGDYGYRFNDYWGQGTQVTVSS

Figura 2

12B6 QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCLASGRITFSYNPMGWERQAPGKERDVAALISRTGGSTYYAR
 12A2 QVKLESSEGGGLVQAGGALRLSCLASGRITFSYNPMGWERQAPGKERDLVAALISRTGGSTYYPD
 12F2 QVKLVESGGGLVQAGGALRLSCLASGRITFSYNPMGWERQAPGKERDVAALISRTGGSTYYPD
 14H10 QVKLESSEGGGLVQAGGALRLSCLASGRITFSYNPMGWERQAPGKERDVAALISRTGGSTYYPD

 12B6 SVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
 12A2 SVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
 12F2 SVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAGVRAEDGRVRLPSEYTFWGQGTQVTVSS
 14H10 SVEGRFTISRDNAKRMVYLEMNNLSLKPEDTAVYYCAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

Figura 3

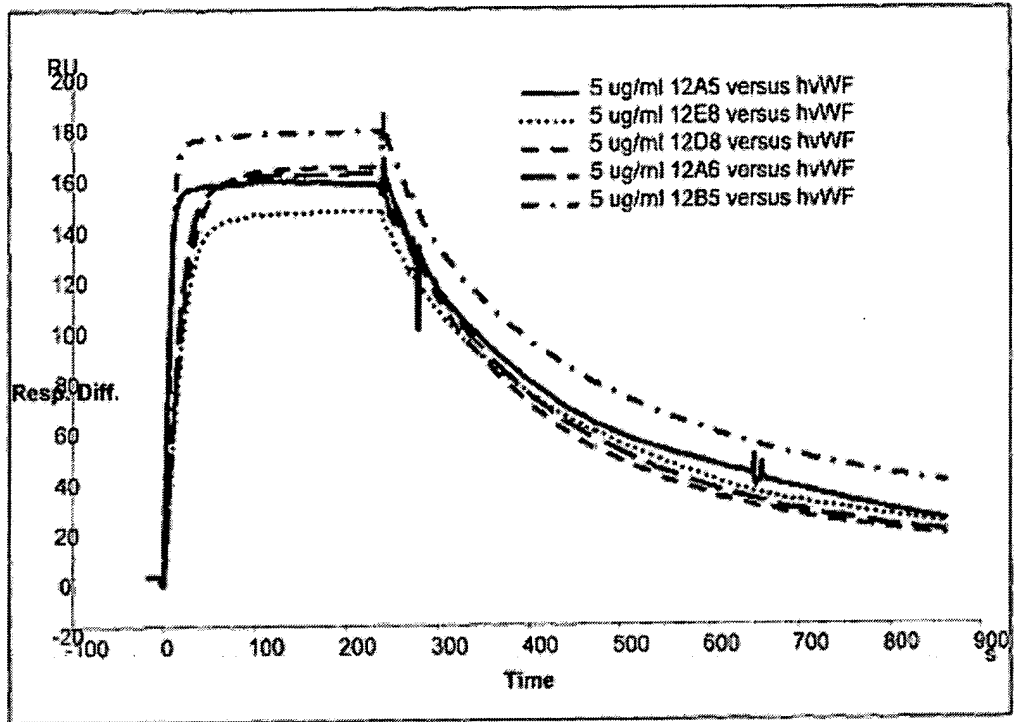


Figura 4

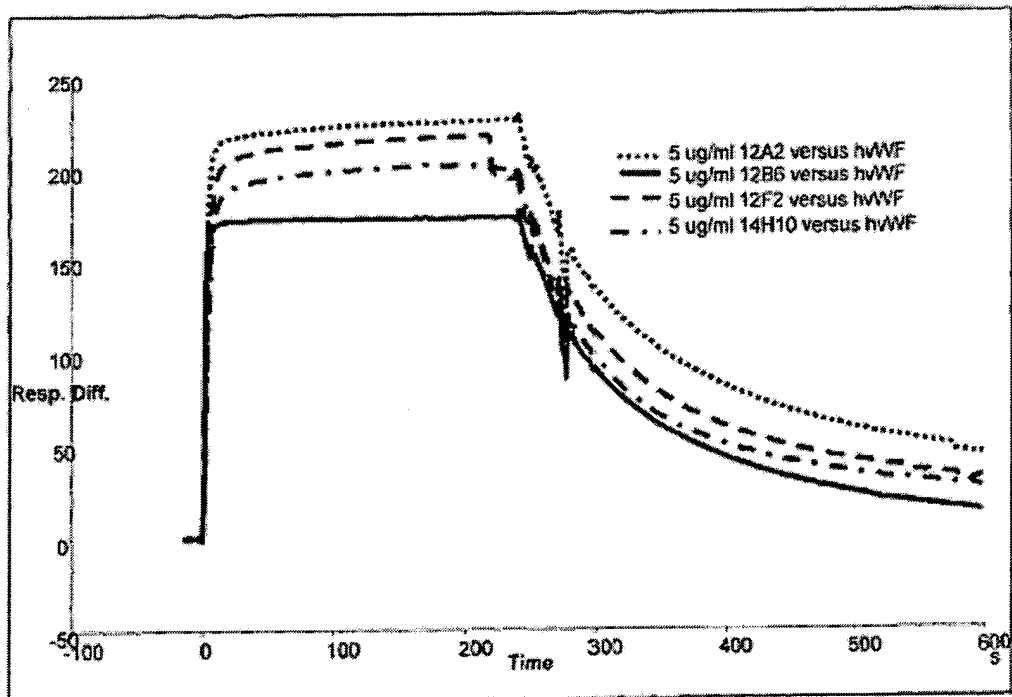


Figura 5

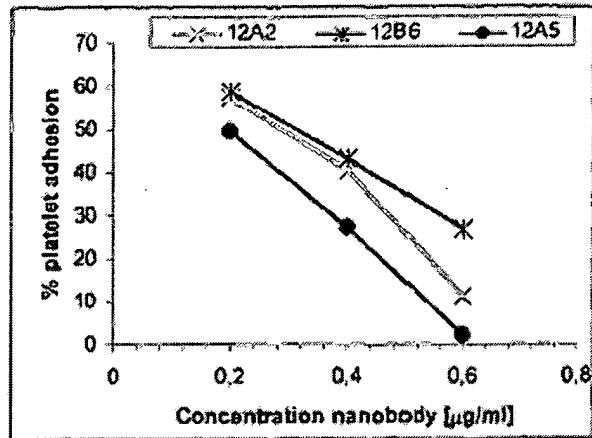


Figura 6

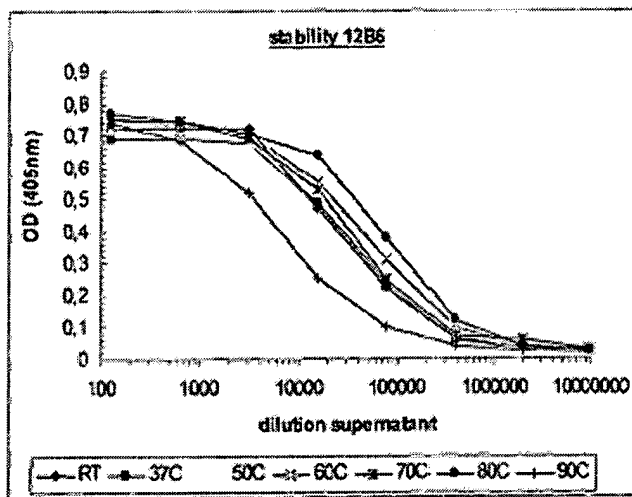


Figura 7A

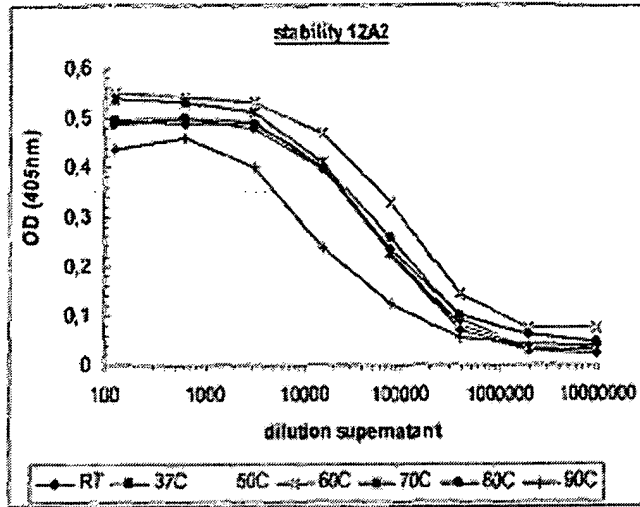


Figura 7B

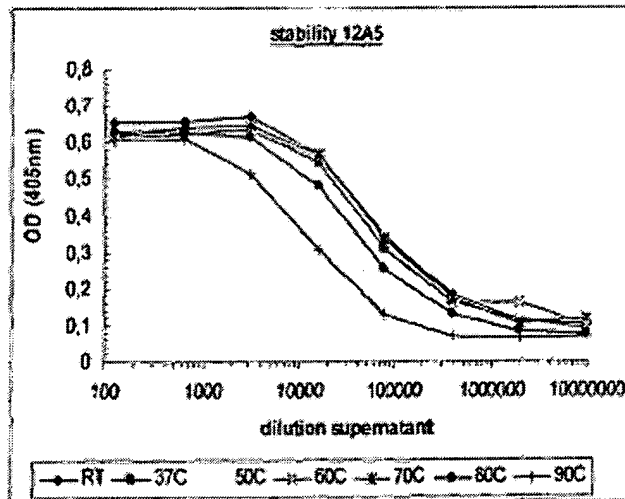


Figura 7C

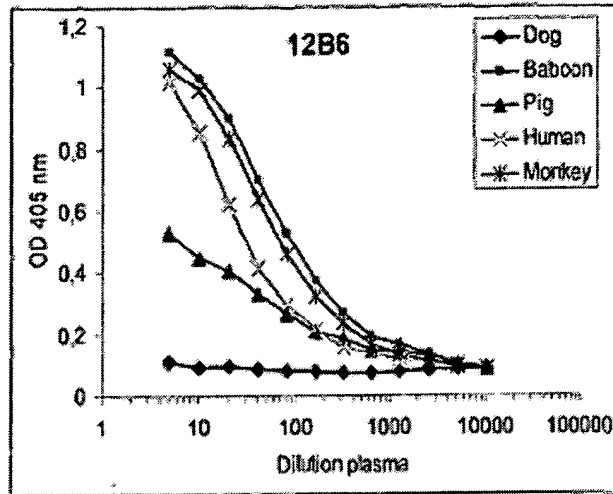


Figura 8A

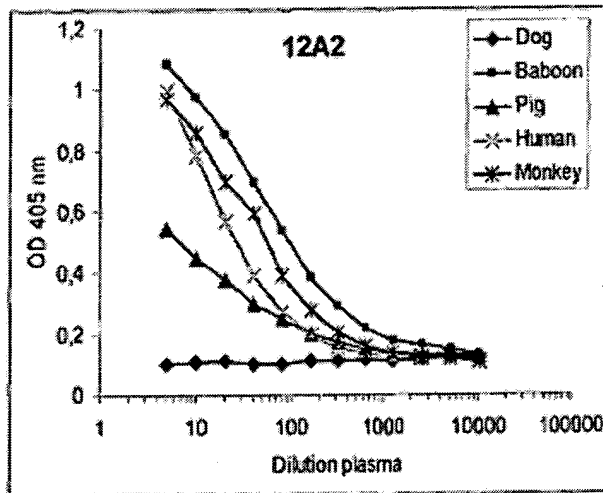


Figura 8B

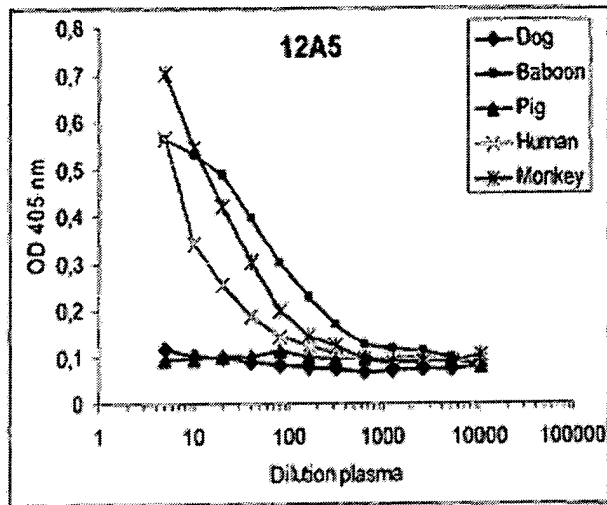


Figura 8C

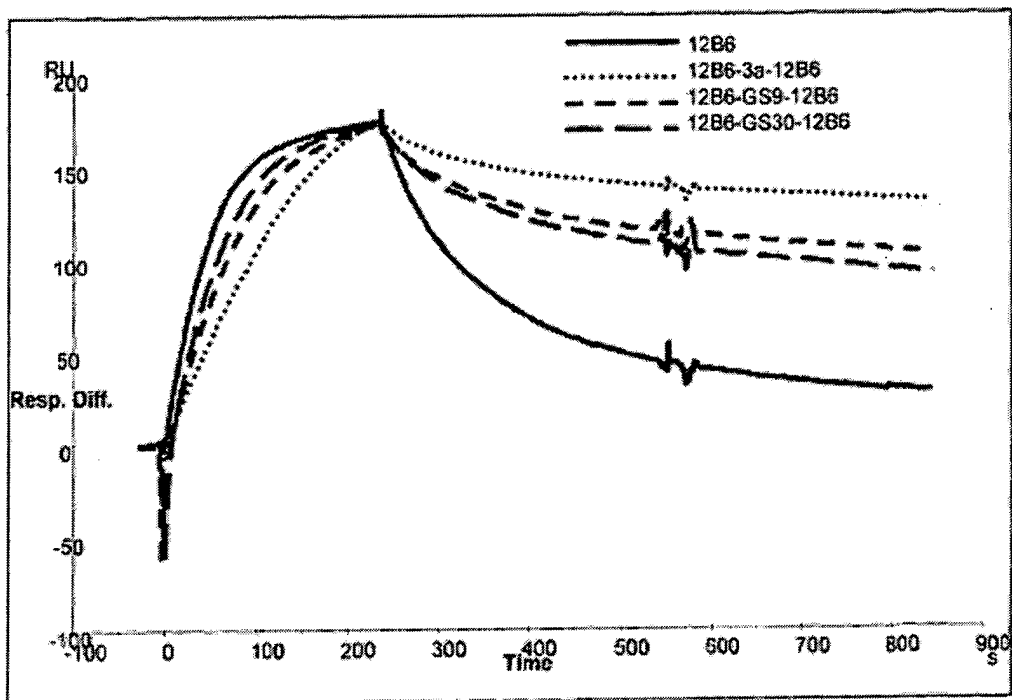


Figura 9

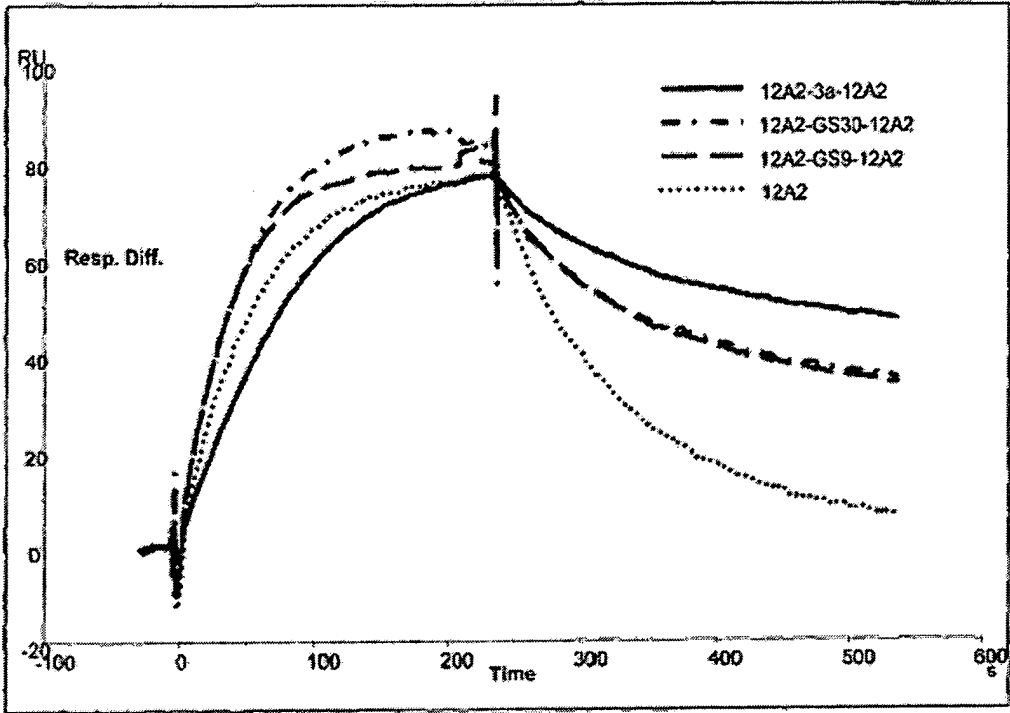


Figura 10

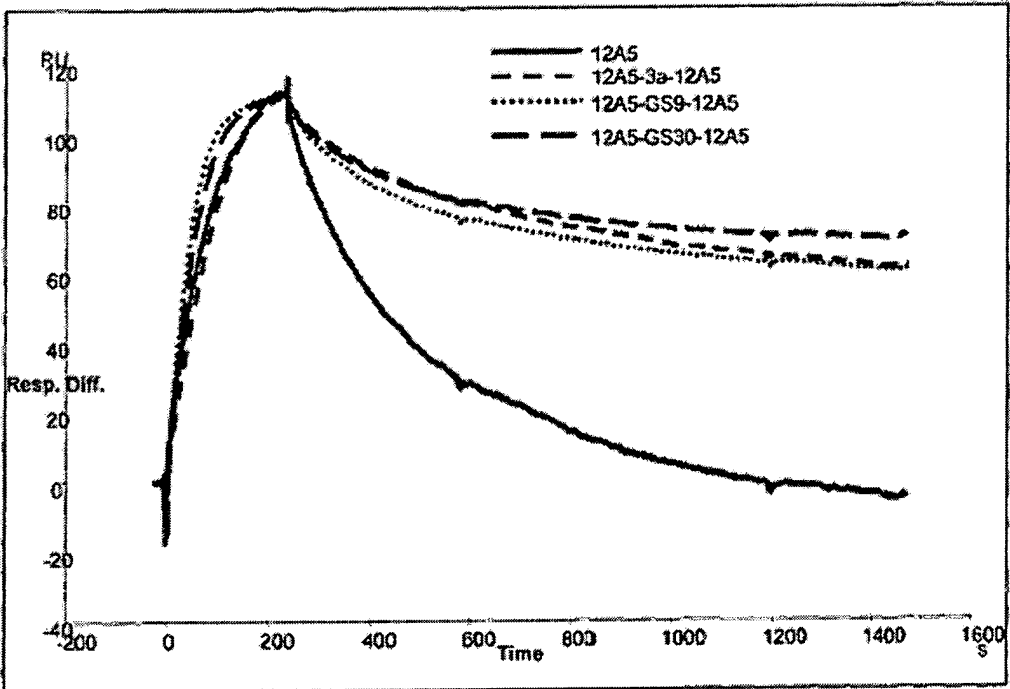


Figura 11

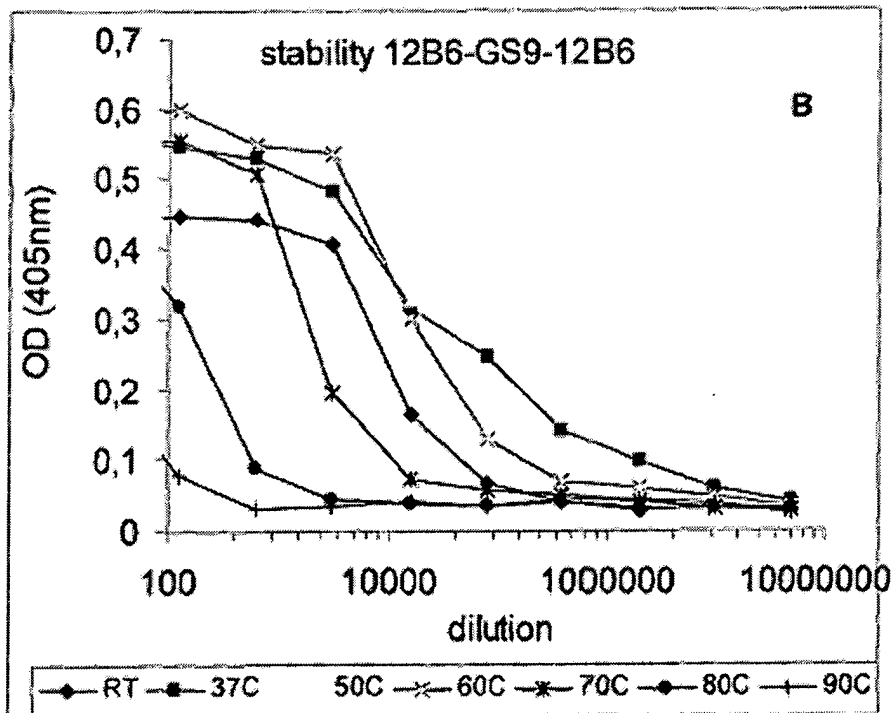
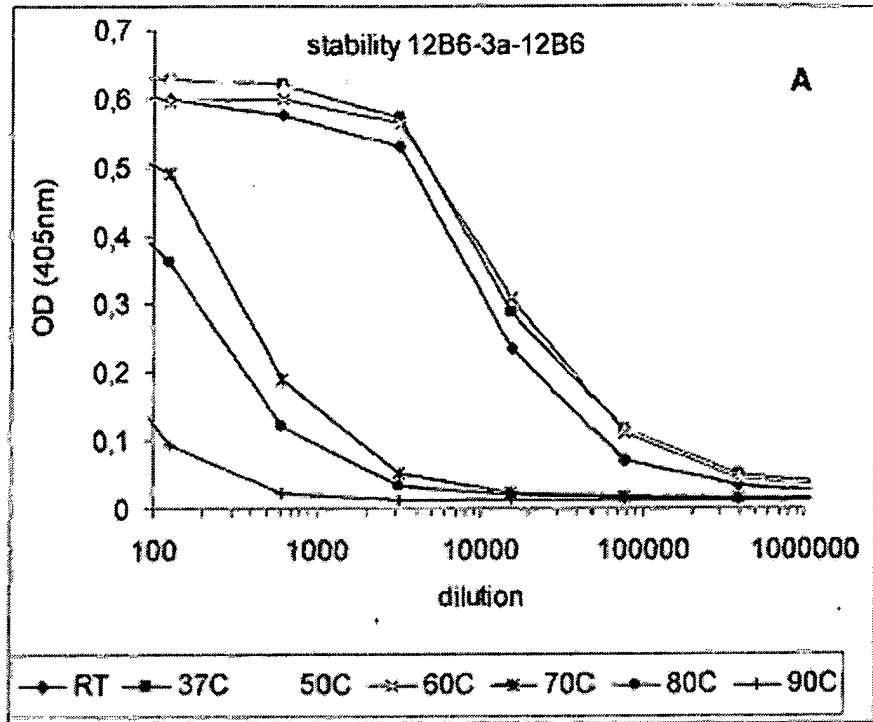


Figura 12-1

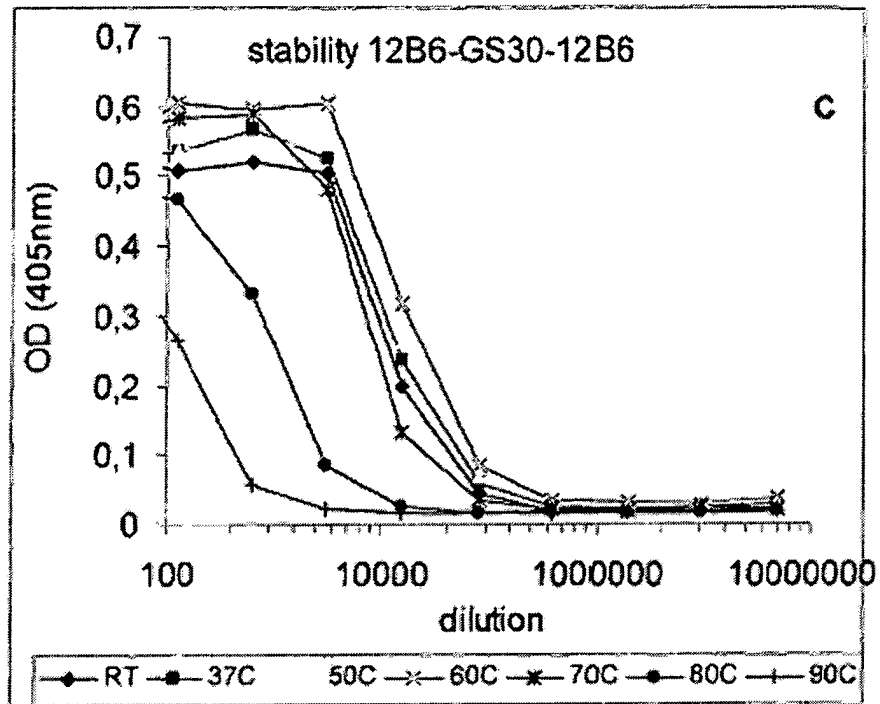


Figura 12-2

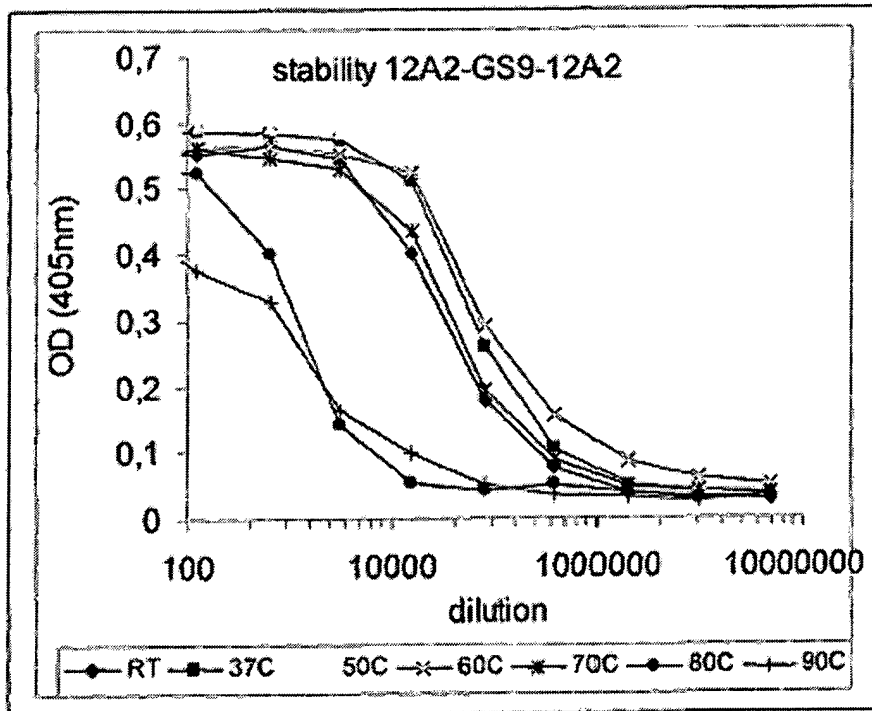
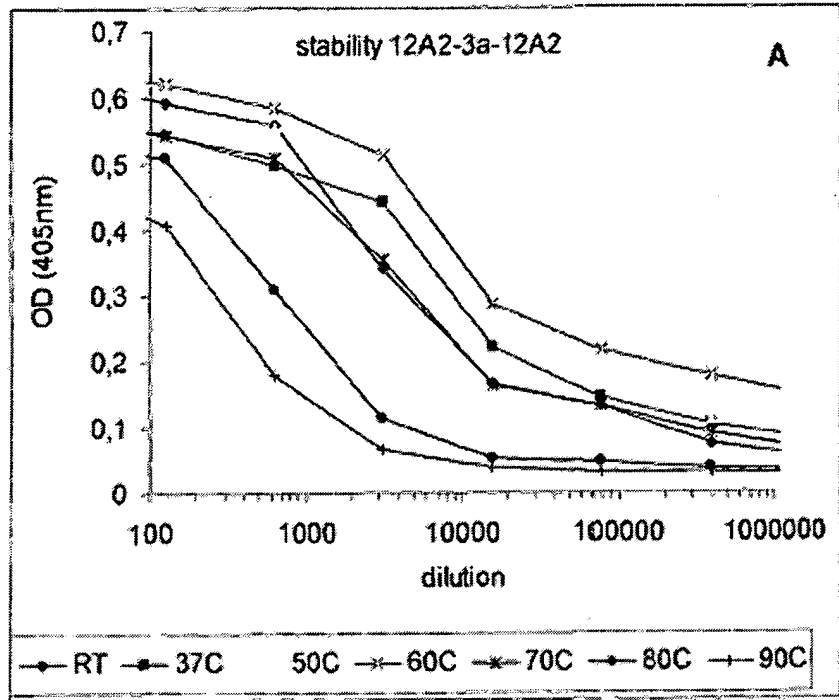


Figura 13-1

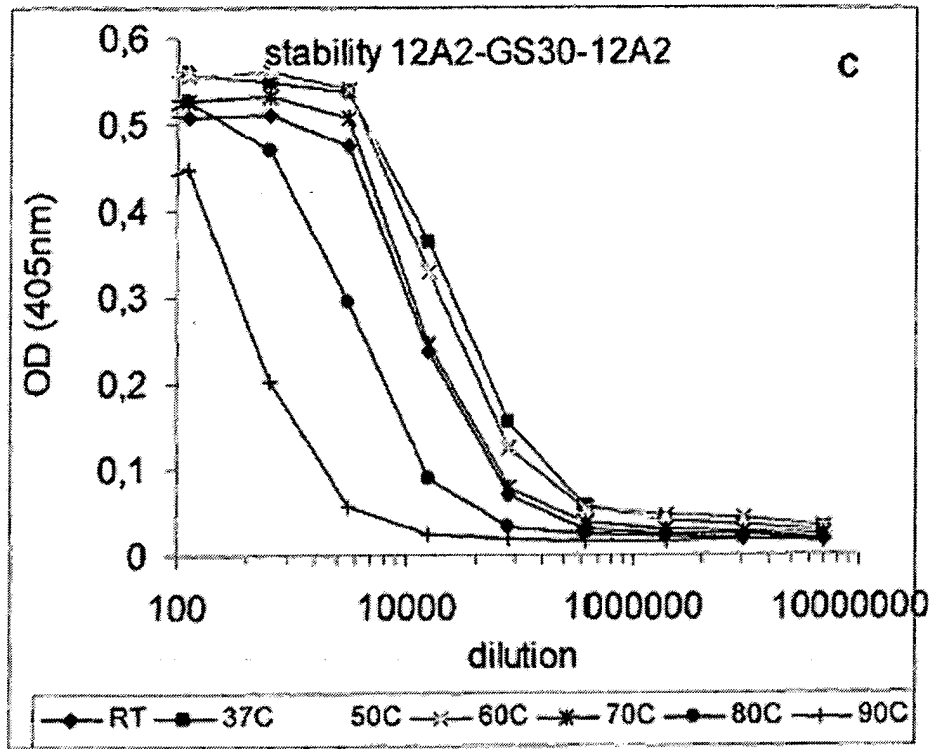


Figura 13-2

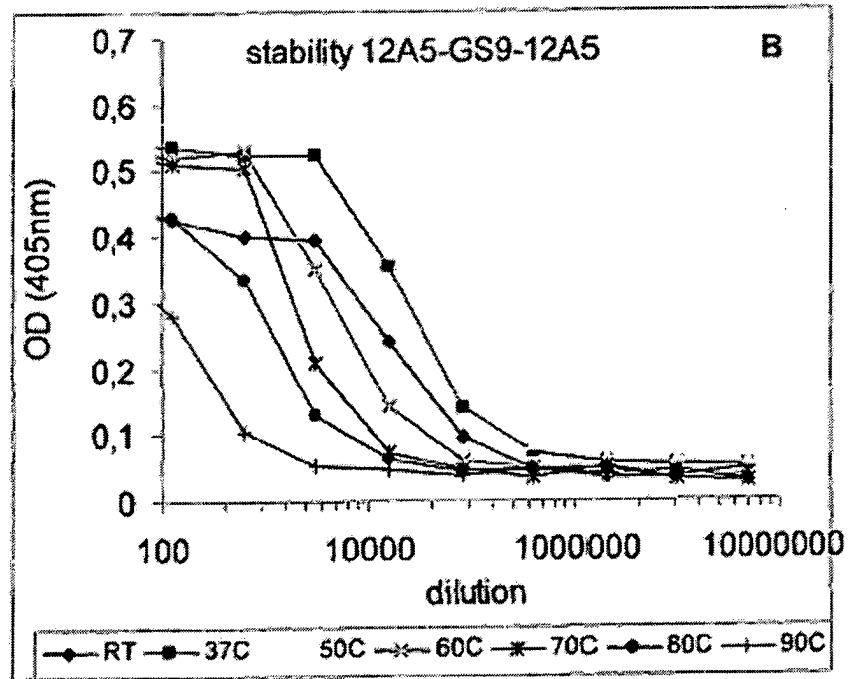
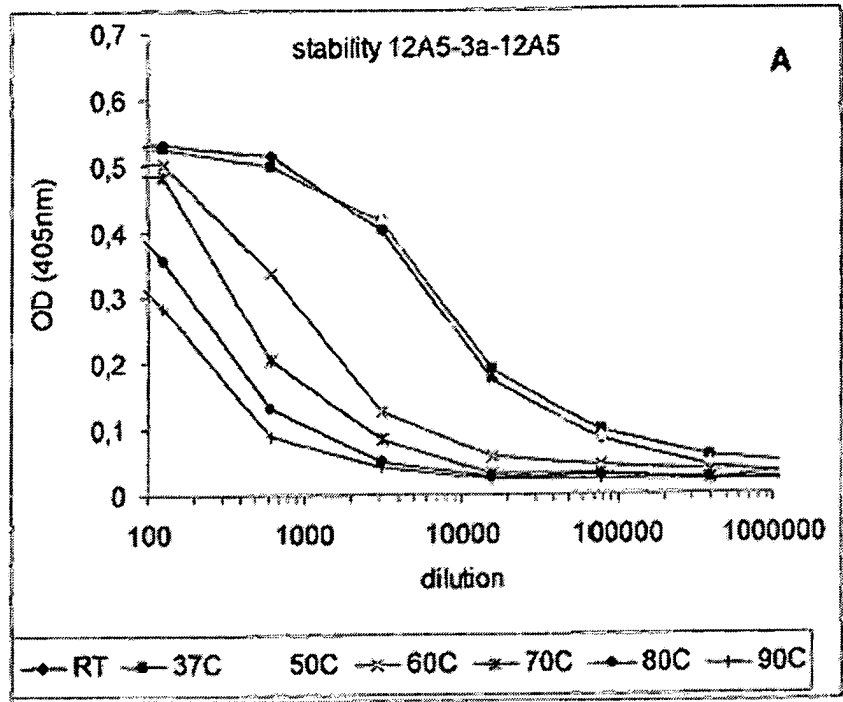
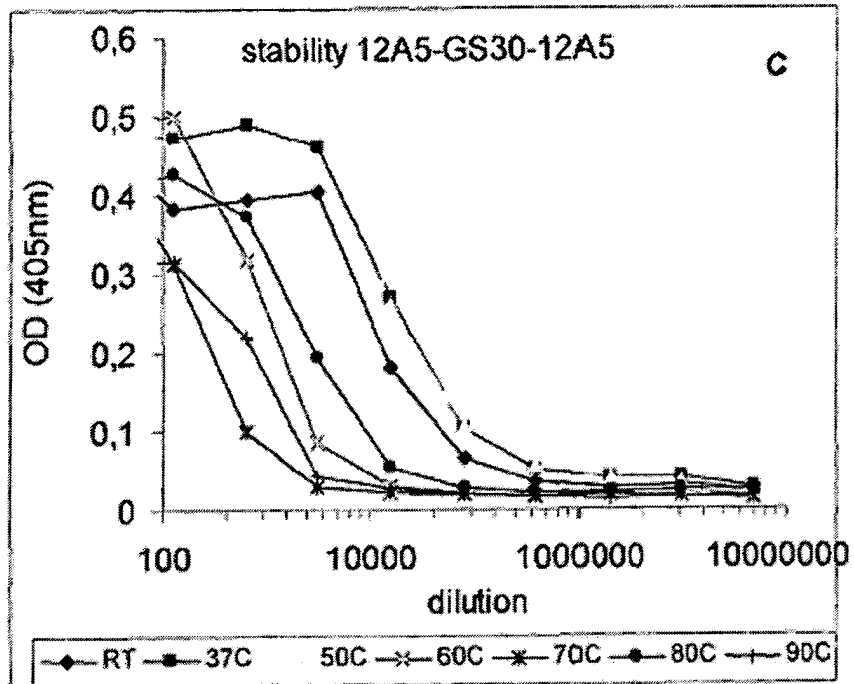


Figura 14-1



12B6	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNEMGWFRQAPGKERDVA
12B6H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNEMGWFRQAPGKGRDVA
12B6H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNEMGWFRQAPGKGRDVA
12B6H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNEMGWFRQAPGKGRDVA
12B6H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYUFGWFRQAPGKGRDVA
12B6	ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALRAEDTA
12B6H1	ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALRAEDTA
12B6H2	ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALRAEDTA
12B6H3	ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALRAEDTA
12B6H4	ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNALRAEDTA
12B6	VYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYNFWGGTQVTVSS
12B6H1	VYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYNFWGGTQVTVSS
12B6H2	VYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYNFWGGTQVTVSS
12B6H3	VYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYNFWGGTQVTVSS
12B6H4	VYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYNFWGGTQVTVSS

Figura 15

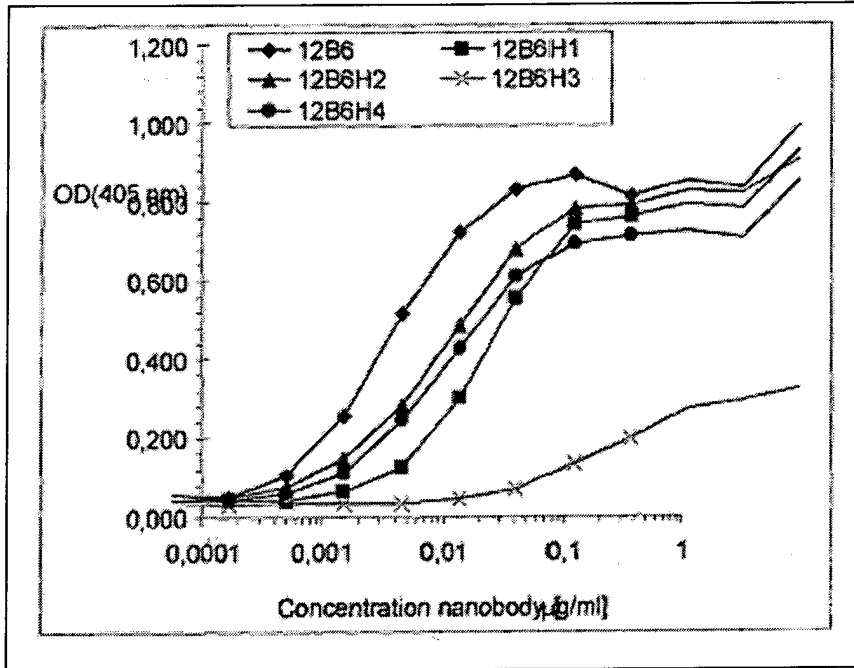


Figura 16

12A2	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTEFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAA
12A2H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTEFSYNPMGWFRQAPGKGRSLVAA
12A2H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTEFSYNPMGWFRQAPGKGRSLVAA
12A2H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTEFSYNPMGWFRQAPGKGRSLVAA
12A2H11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTEFSYNPMGWFRQAPGKGRSLVAA
12A2H13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTEFSYNPMGWFRQAPGKGRSLVAA
12A2	ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNILKPEDTAVYYCAA
12A2H1	ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNILRAEDTAVYYCAA
12A2H3	ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNILRAEDTAVYYCAA
12A2H4	ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNILRAEDTAVYYCAA
12A2H11	ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNILRAEDTAVYYCAA
12A2H13	ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNILRAEDTAVYYCAA
12A2	GVRAEDGRVRTLPSEYTFWCGGTQVTVSS
12A2H1	GVRAEDGRVRTLPSEYTFWCGGTQVTVSS
12A2H3	GVRAEDGRVRTLPSEYTFWCGGTQVTVSS
12A2H4	GVRAEDGRVRTLPSEYTFWCGGTQVTVSS
12A2H11	GVRAEDGRVRTLPSEYTFWCGGTQVTVSS
12A2H13	GVRAEDGRVRTLPSEYTFWCGGTQVTVSS

Figura 17

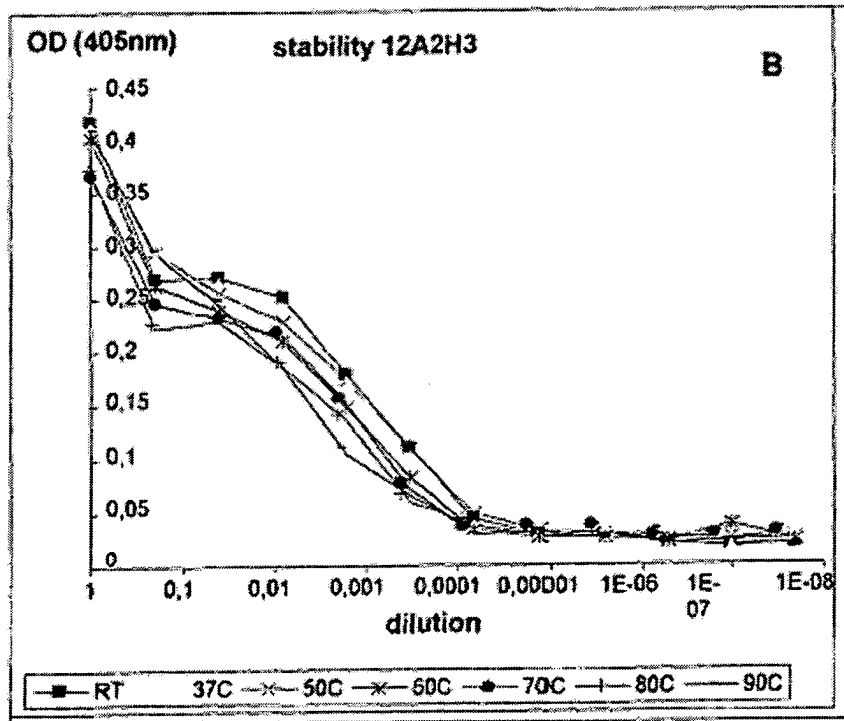
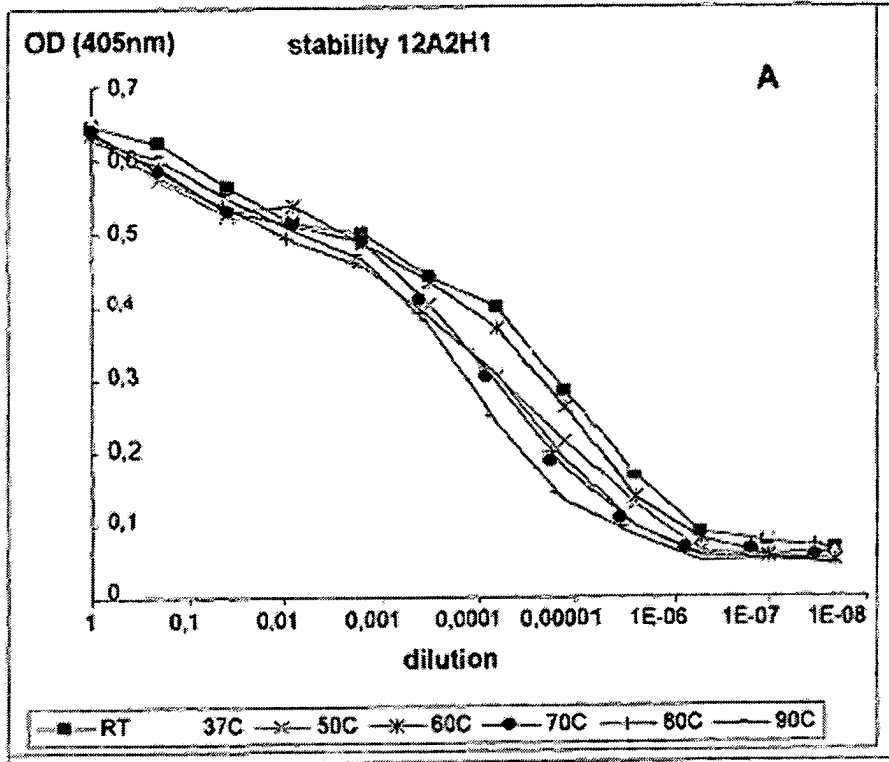


Figura 18 - 1

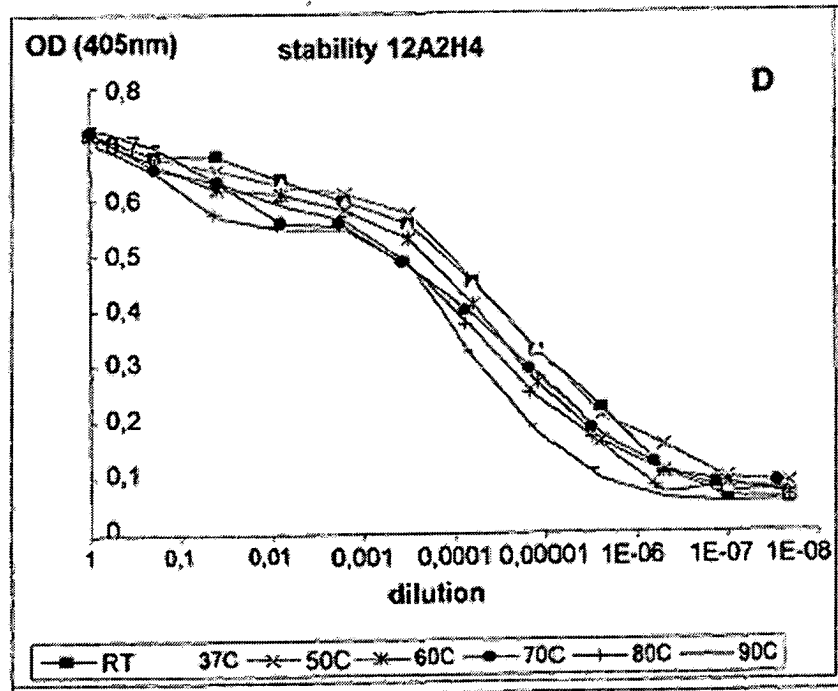
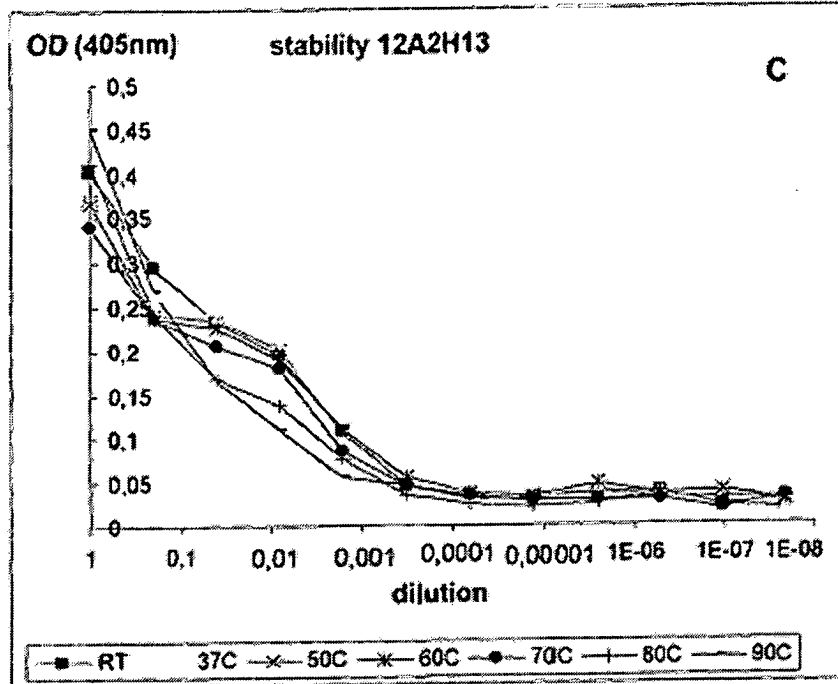


Figura 18 -2

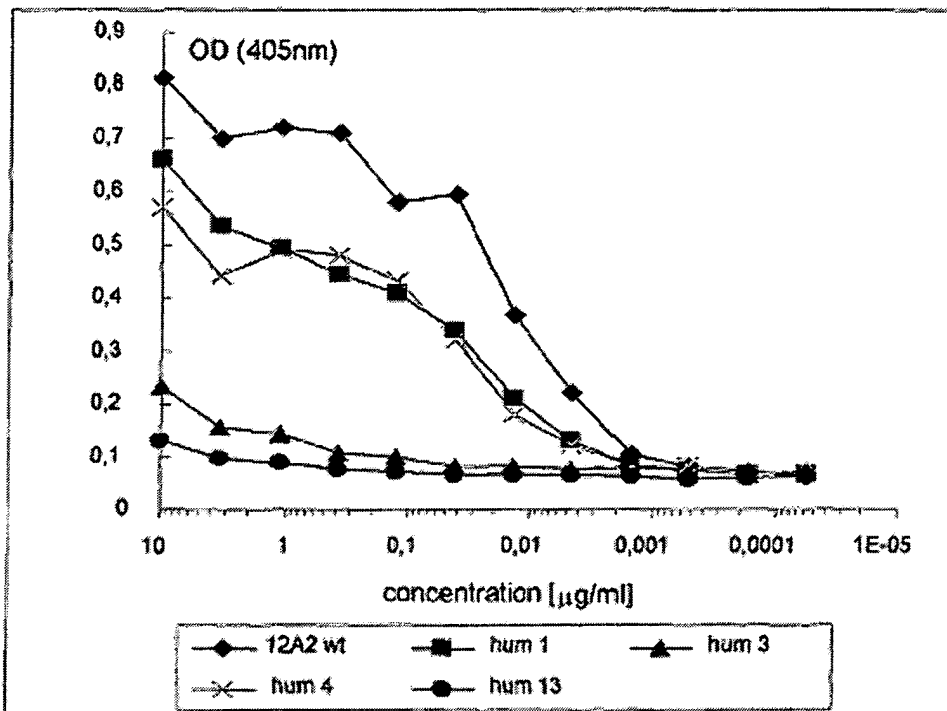


Figura 19

12A5	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSI GAMGMYRQAPGKQREL
12A5H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSI GAMGMYRQAPGKQREL
12A5H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSI GAMGMYRQAPGKQREL
12A5H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSI GAMGMYRQAPGKQREL
12A5	VATITSGGSTNYADPVKGRFTISR DGPKN TVYLQMN SLKPEDTAVYY
12A5H1	VATITSGGSTNYADPVKGRFTISR DGPKN TVYLQMN SLRAEDTAVYY
12A5H2	VATITSGGSTNYADPVKGRFTISR DGAKN TVYLQMN SLRADDTAVYY
12A5H3	VATITSGGSTNYADPVKGRFTISR DVAKN TVYLQMN SLRADDTAVYY
12A5	CYANLKQGSYGYRENDYWGQGTQVTVSS
12A5H1	CYANLKQGSYGYRENDYWGQGTQVTVSS
12A5H2	CYANLKQGSYGYRENDYWGQGTQVTVSS
12A5H3	CYANLKQGSYGYRENDYWGQGTQVTVSS

Figura 20

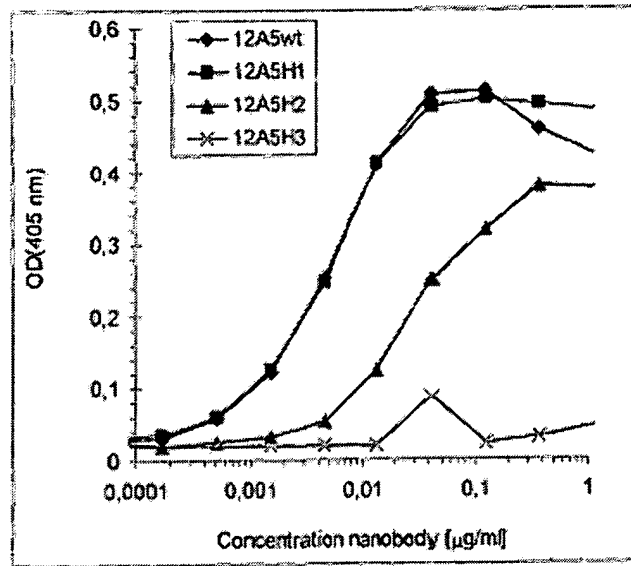


Figura 21

12A2H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPWGFRQAPGKGR ELVA
12A2H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPWGFRQAPGKGR ELVA
12B6H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPWGFRQAPGKGR EVVA
12A2H1	<u>AISRTGGSTYYPDSV</u> EGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA
12A2H4	<u>AISRTGGSTYYPDSV</u> EGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA
12B6H2	<u>AISRTGGSTYYARSV</u> EGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA
12A2H1	AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A2H4	AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12B6H2	AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

Figura 22

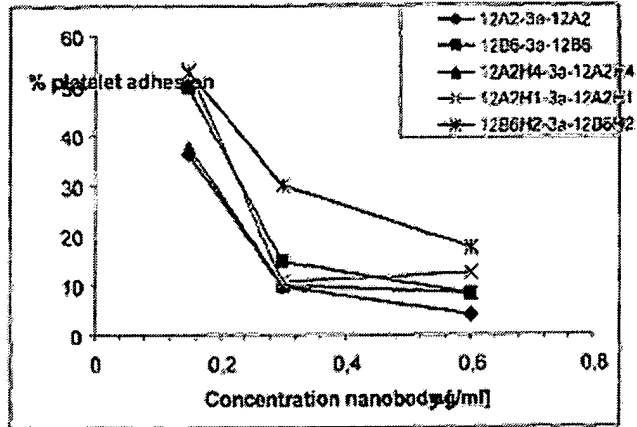


Figura 23

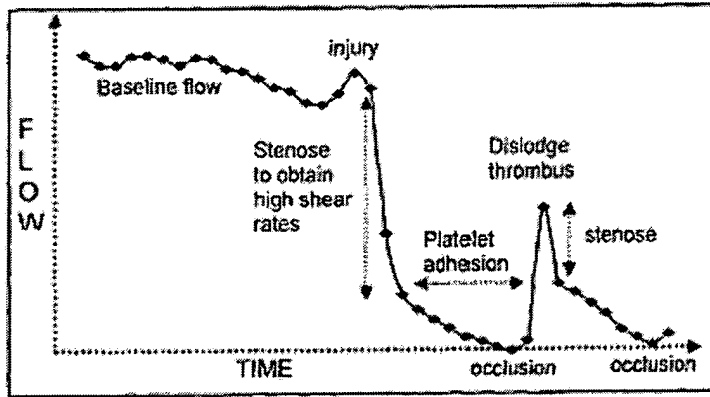


Figura 24

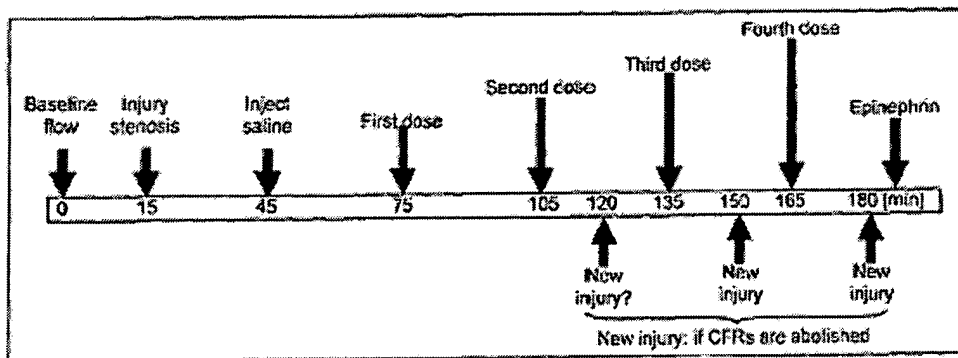


Figura 25

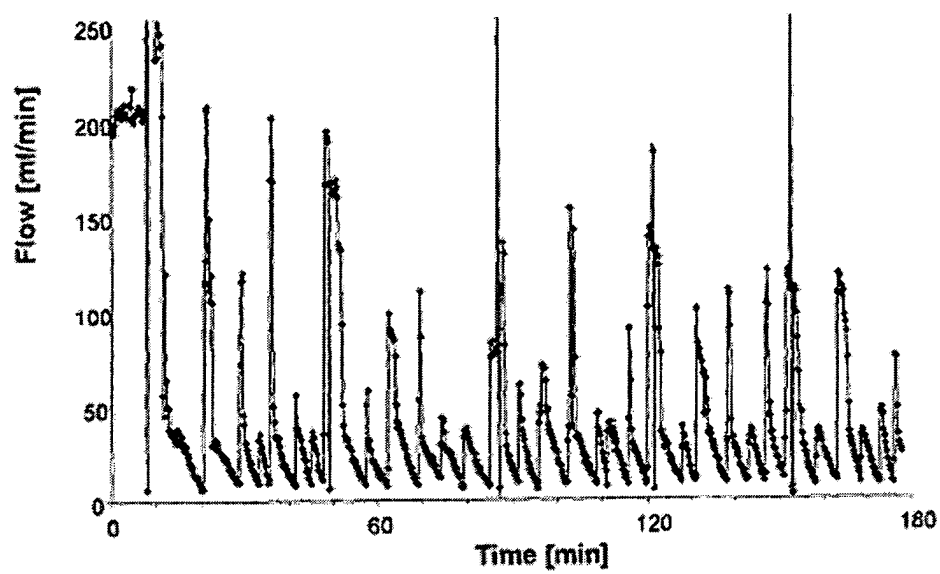


Figura 26

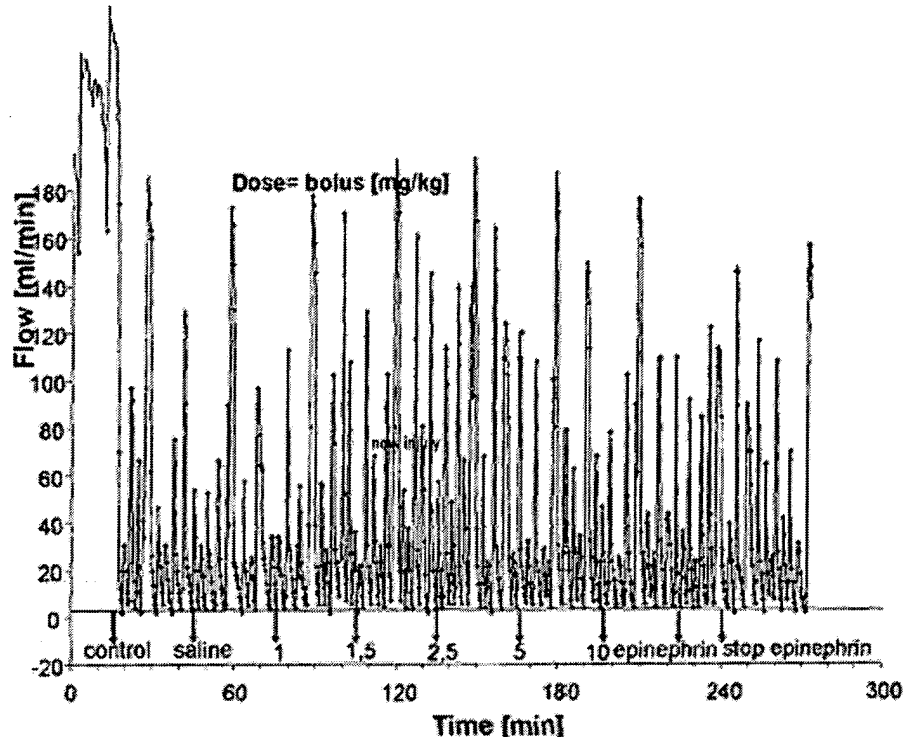


Figura 27

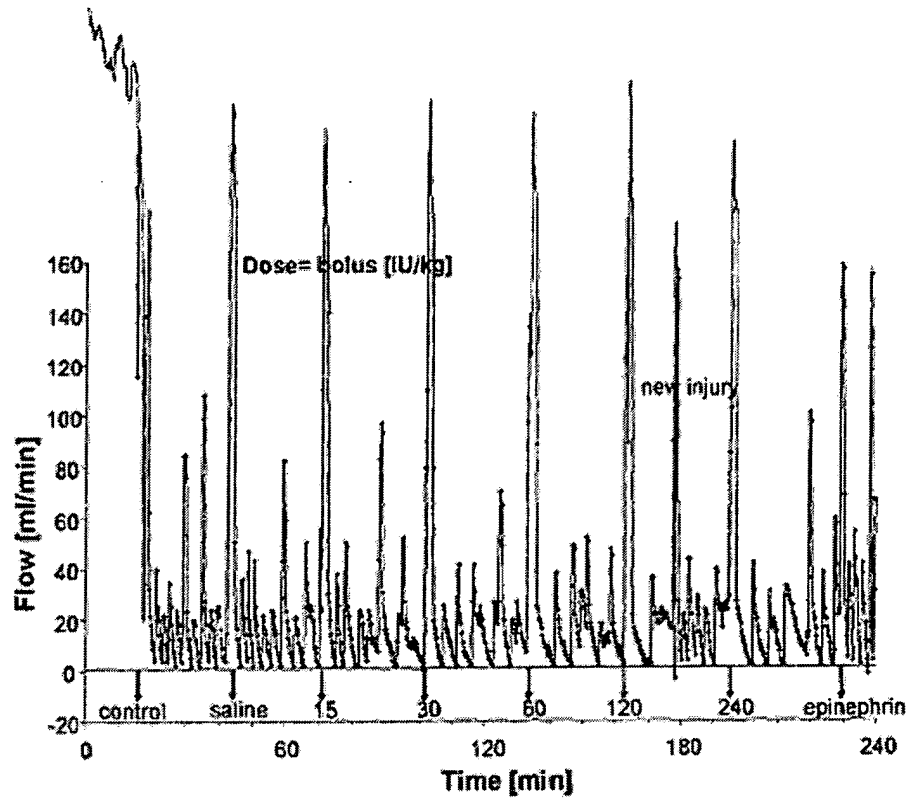


Figura 28

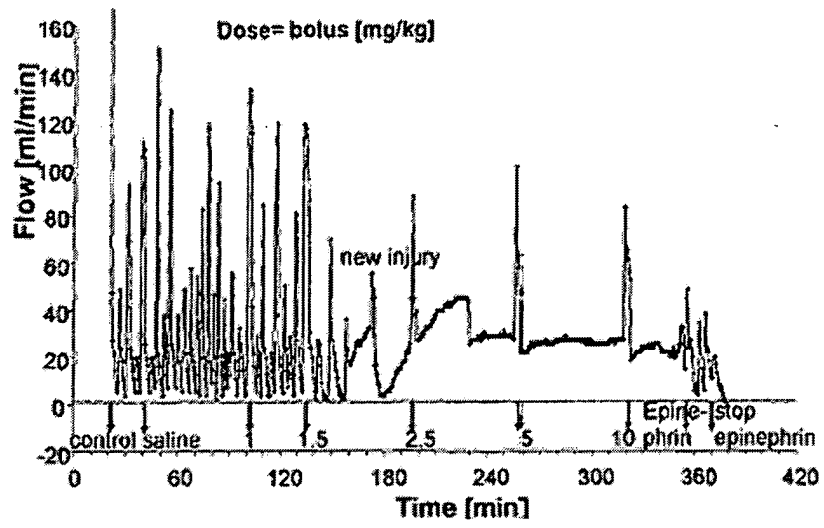


Figura 29

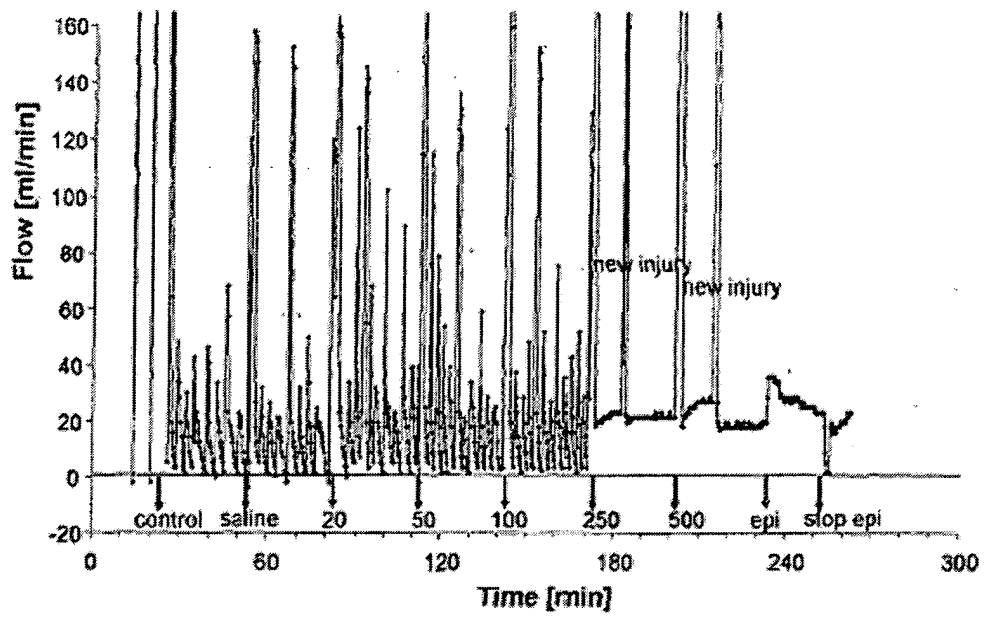


Figura 30

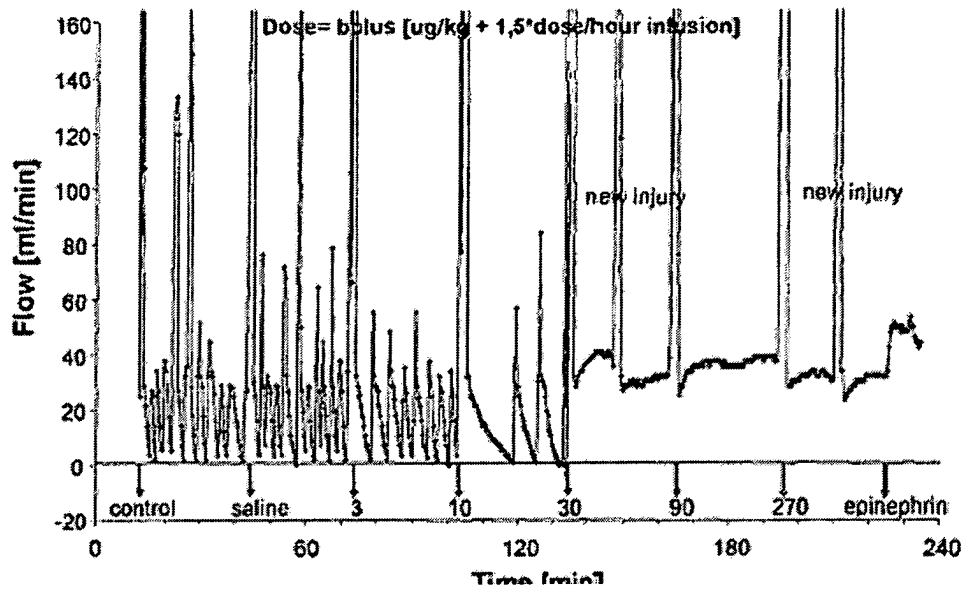


Figura 31

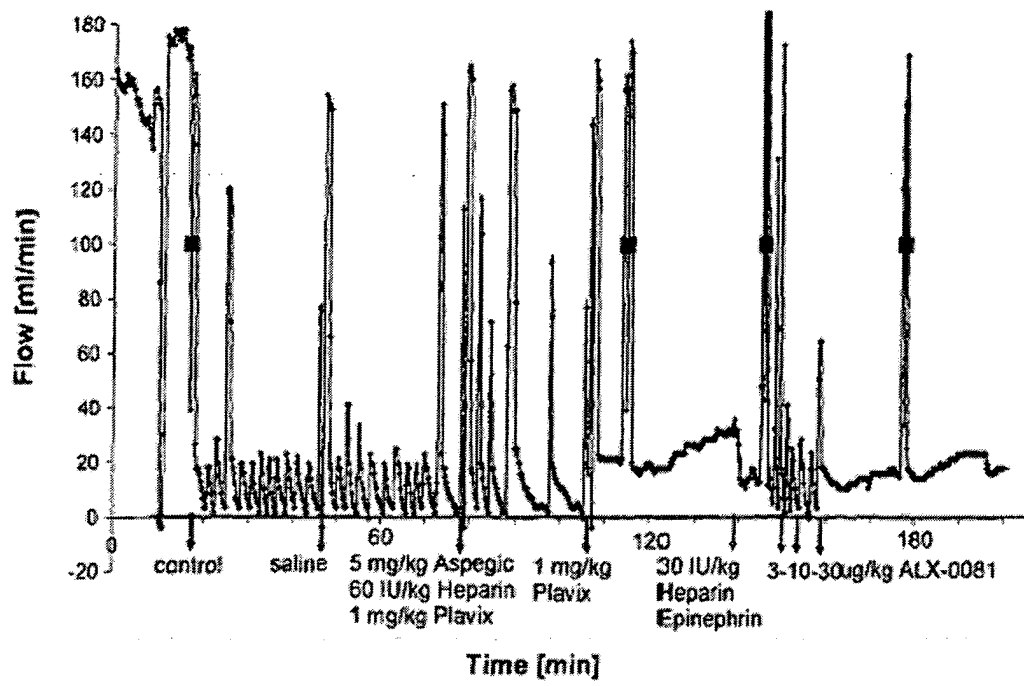


Figura 32

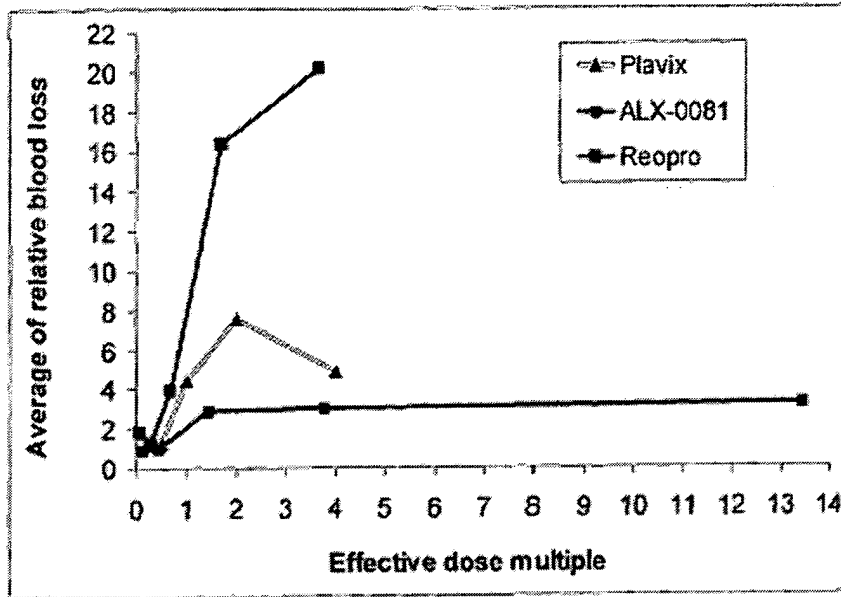


Figura 33

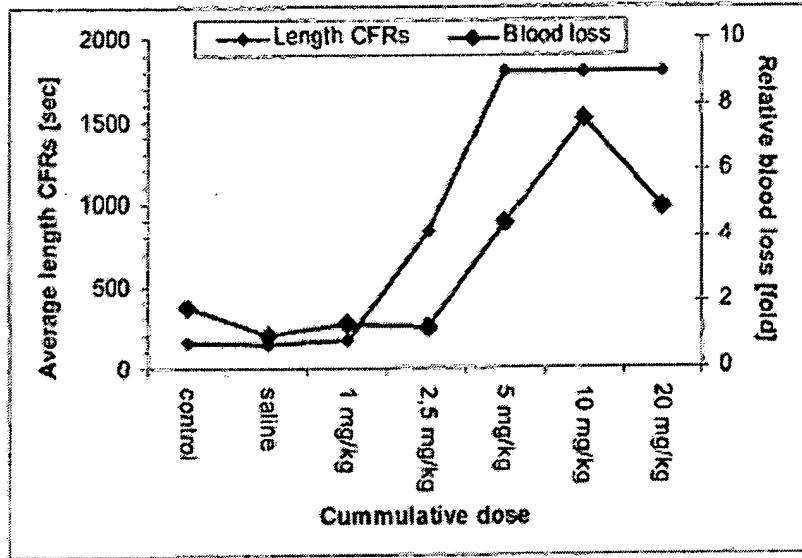


Figura 34

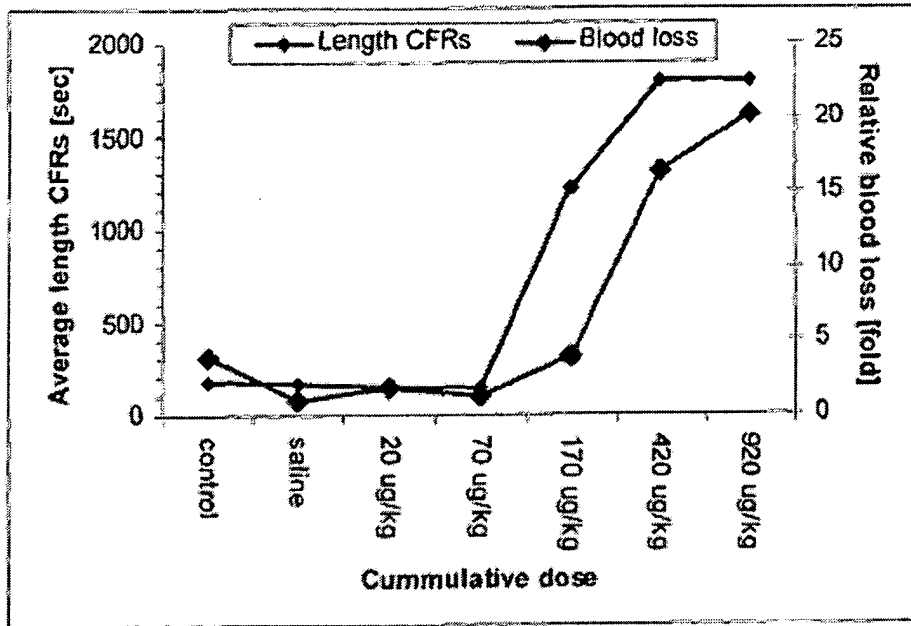


Figura 35

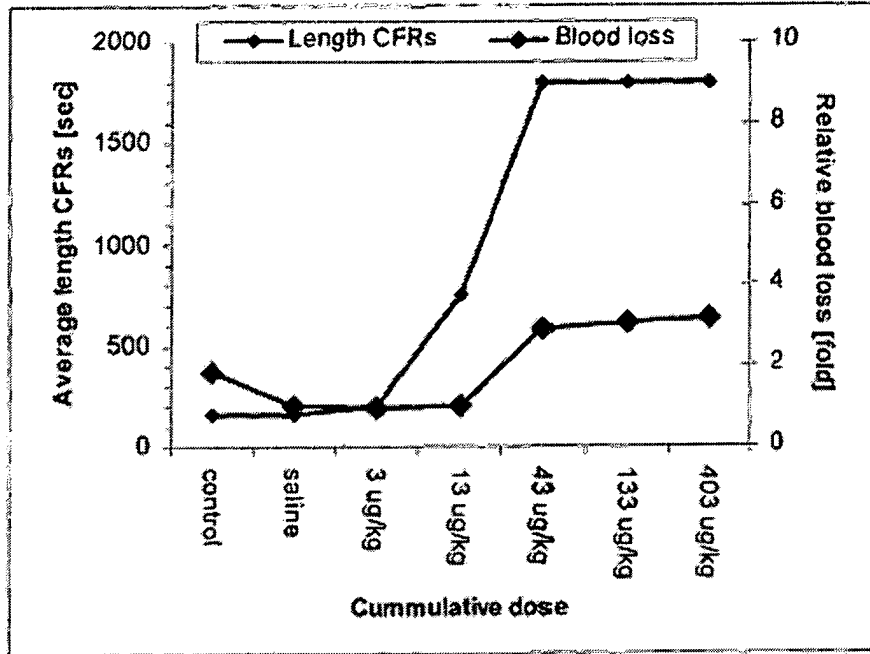


Figura 36

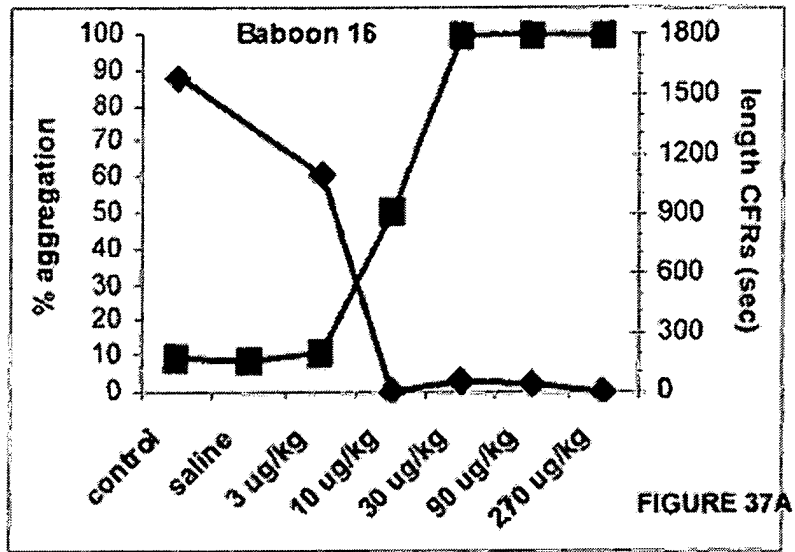


Figura 37A

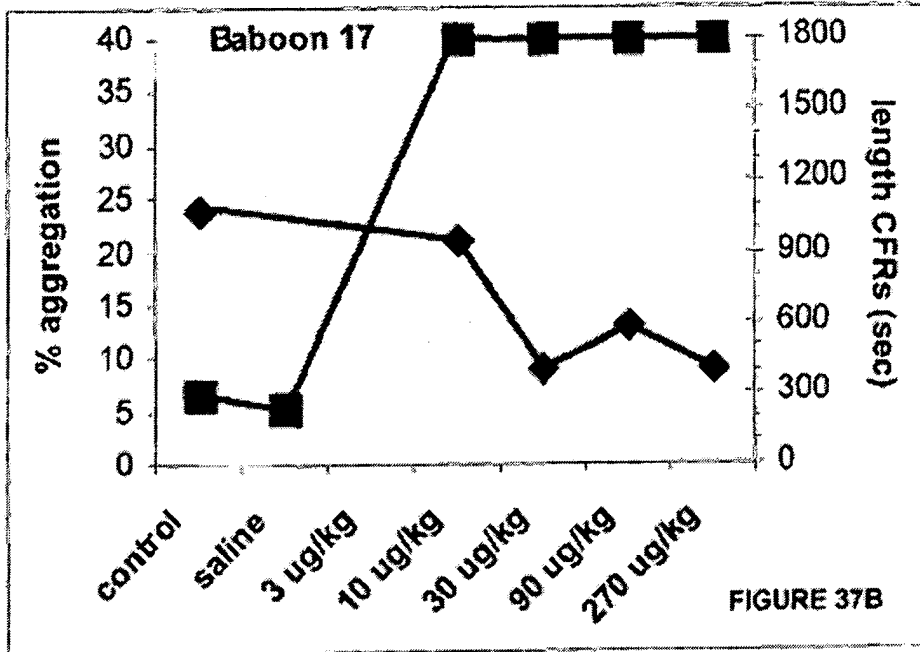


Figura 37B

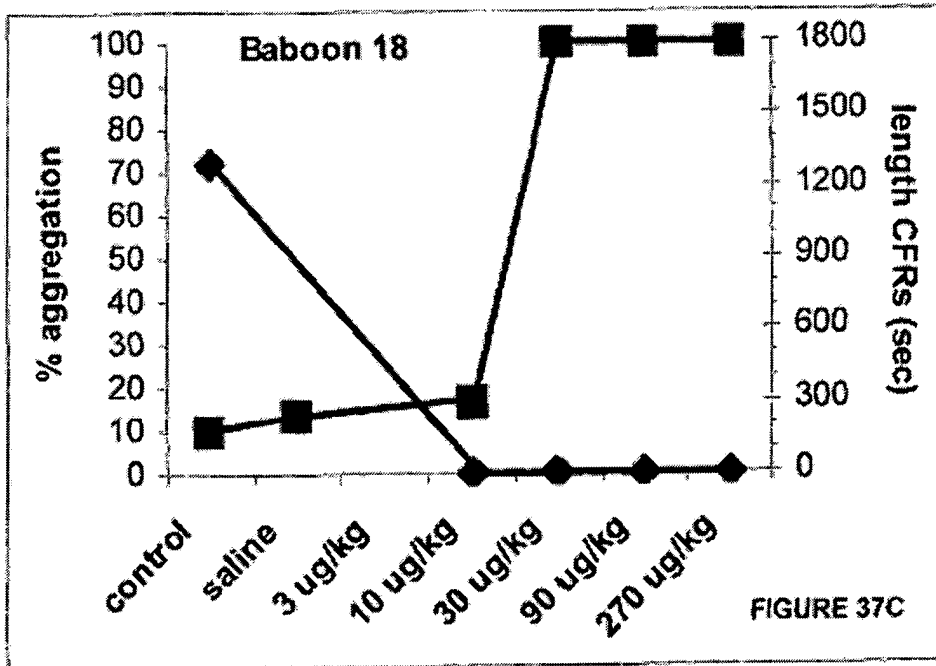


Figura 37C

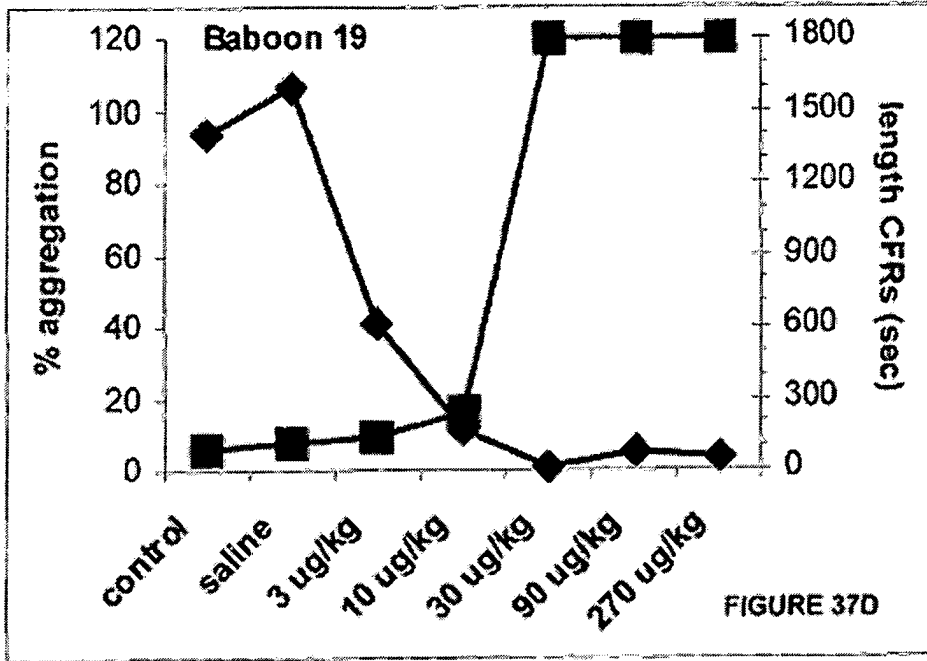


Figura 37 D

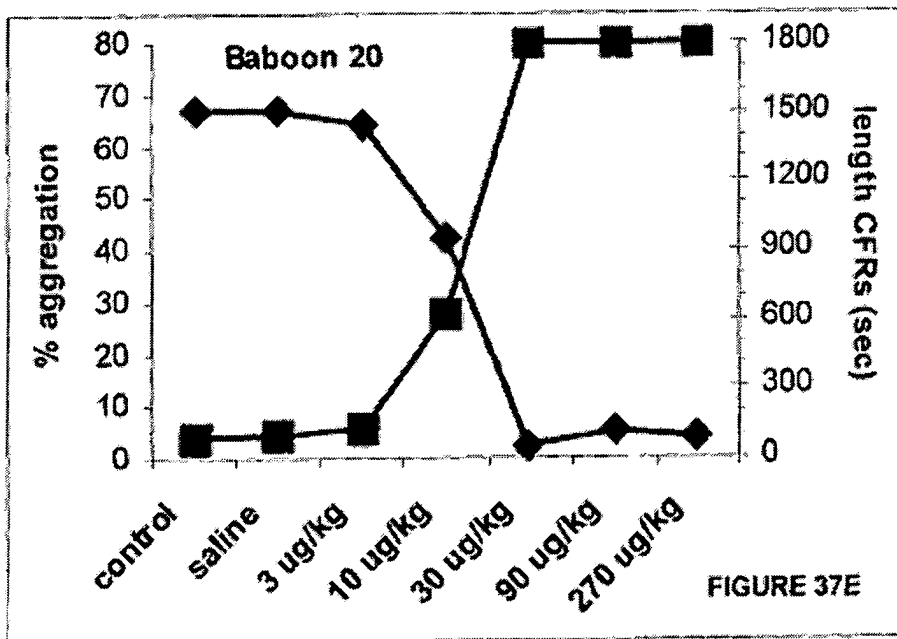


Figura 37 E

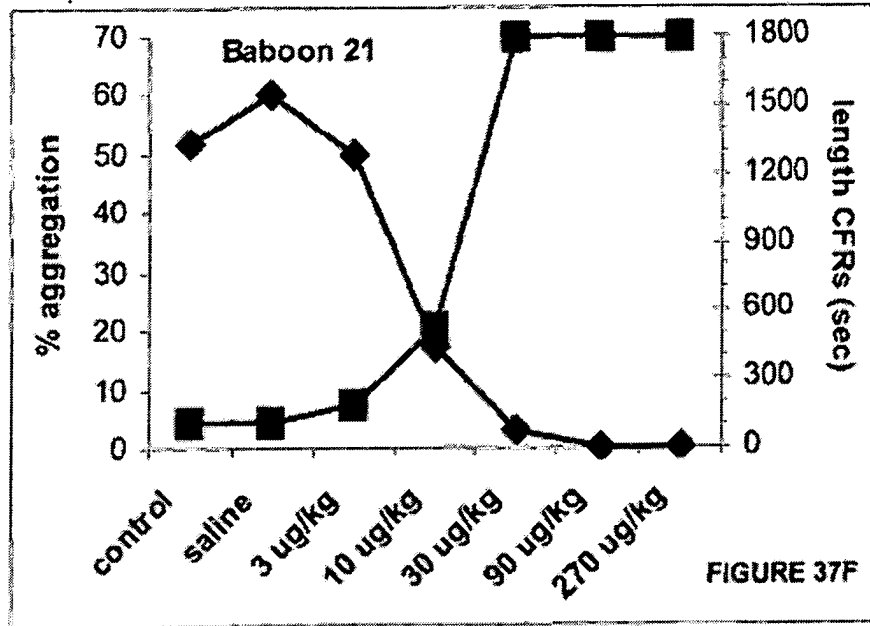


Figura 37F

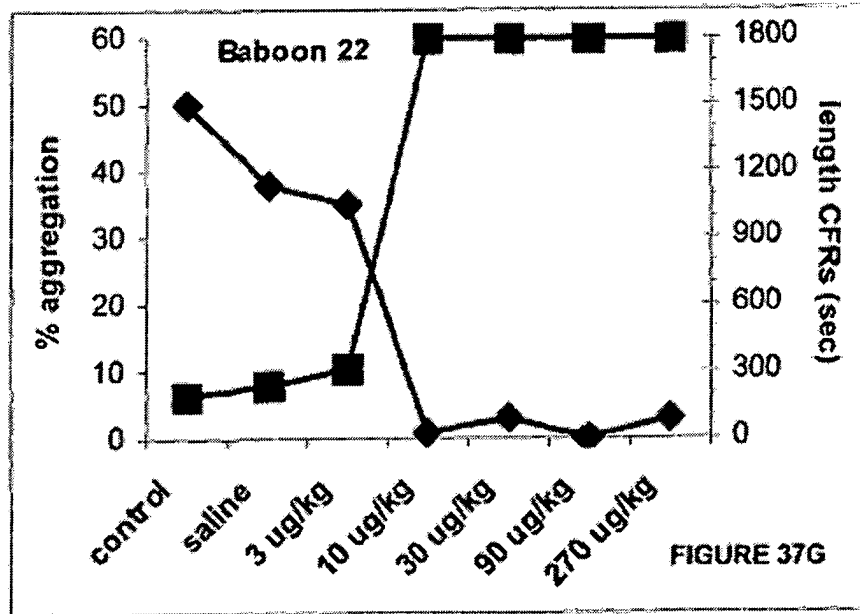


Figura 37G

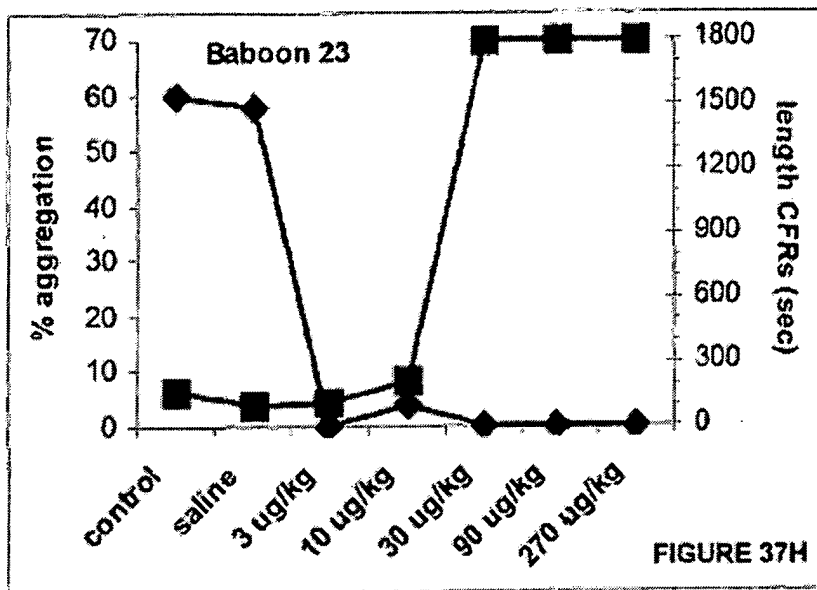


Figura 37 H

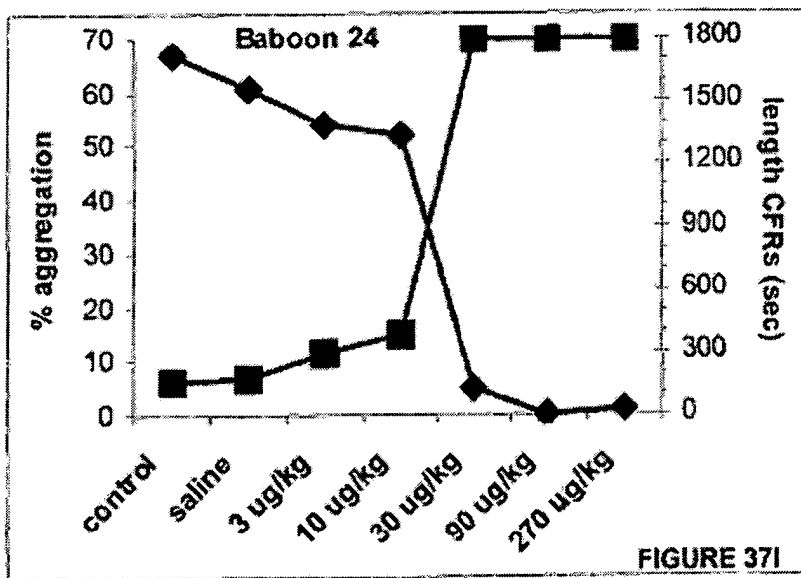


Figura 37 I

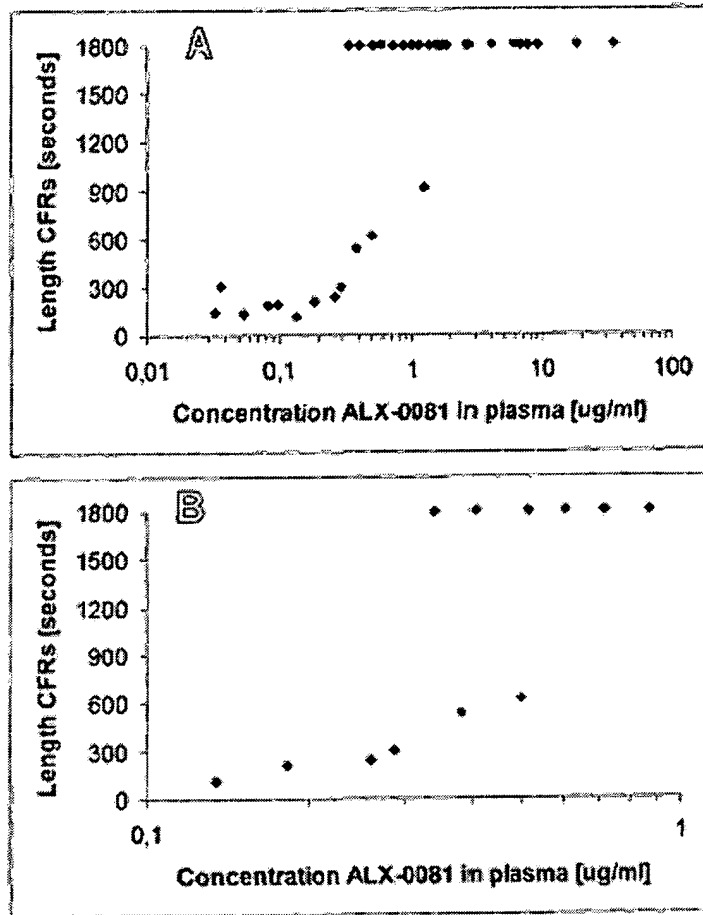


Figura 38

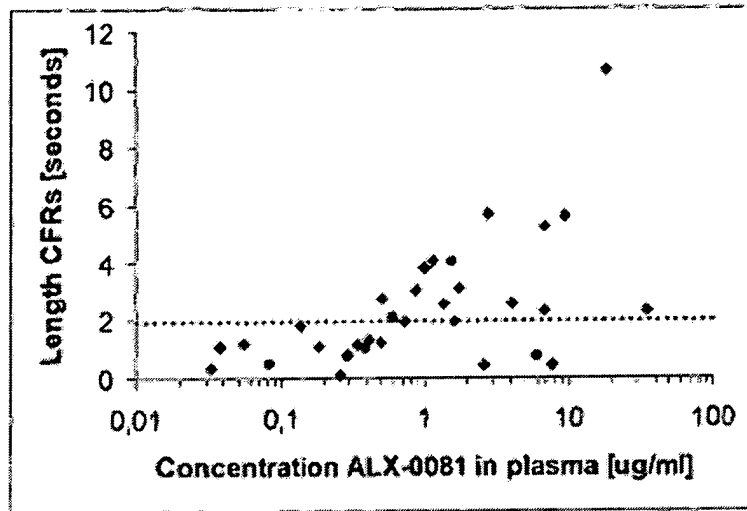


Figura 39

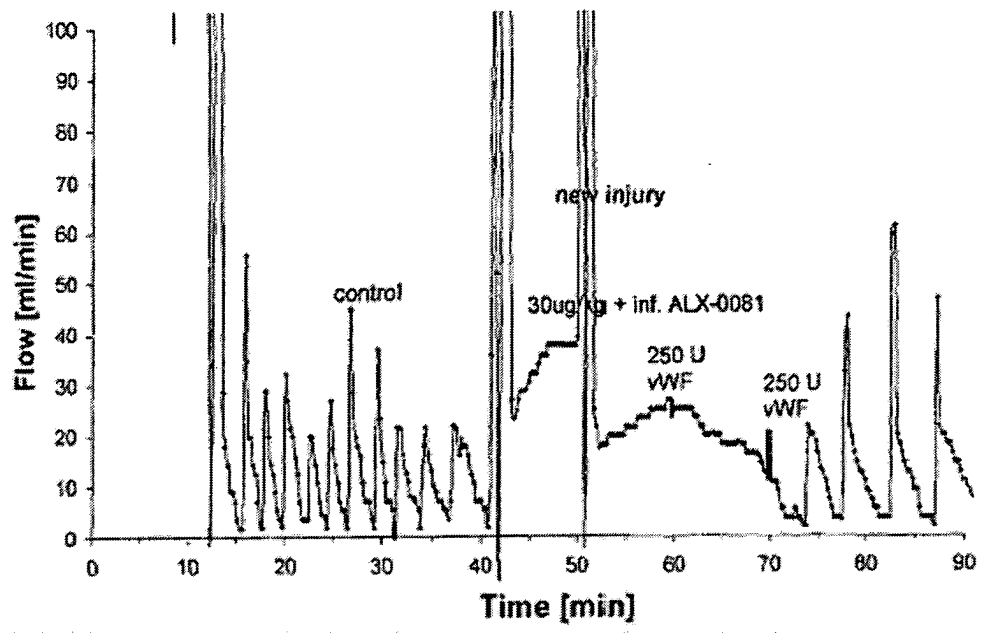


Figura 40

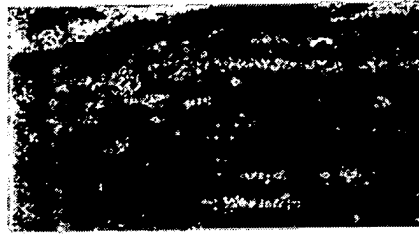


Figura 41

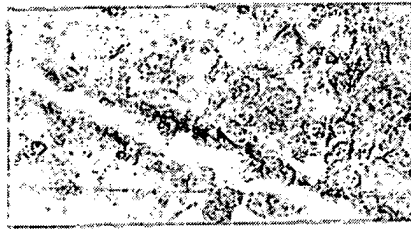


Figura 42

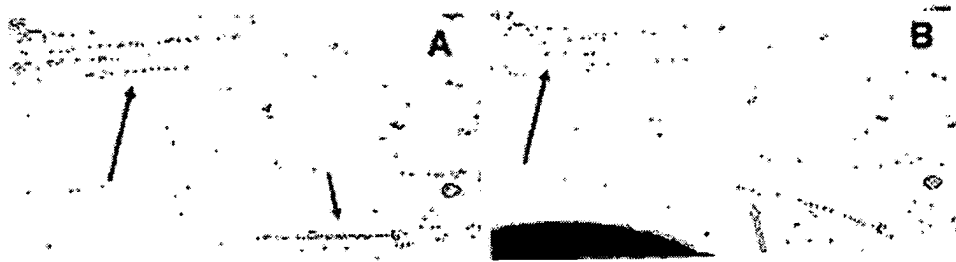


Figura 43

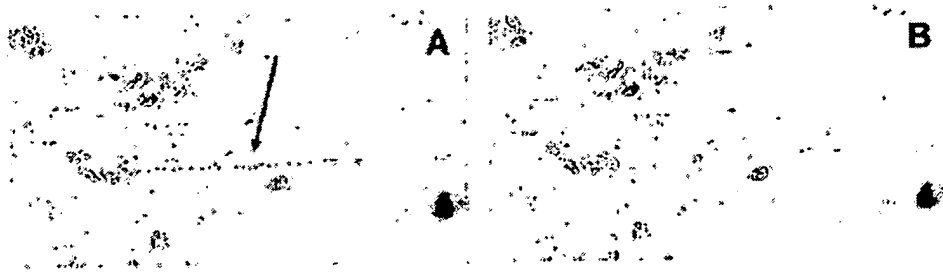


Figura 44

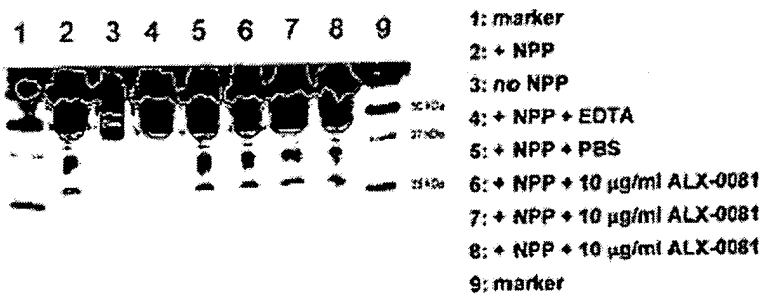


Figura 45

RESUMO

**NANOCORPOS MELHORADOS PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS
MEDIADAS POR AGREGAÇÃO**

A presente invenção se relaciona a nanocorpos
5 melhorado contra o Fator de von Willebrand (vWF), bem como à
polipeptídios compreendendo ou essencialmente compostos de
um ou vários de tais nanocorpos. A invenção também se refere
a ácidos nucléicos que codificam tais nanocorpos e
polipeptídios; a métodos para preparar tais nanocorpos e
10 polipeptídios; apresentar células que expressam ou são
capazes de expressar tais nanocorpos ou polipeptídios, a
composições que compreendem tais nanocorpos, polipeptídios,
ácidos nucléicos ou células hospedeiras; e a usos de tais
nanocorpos, tais polipeptídios, tais ácidos nucléicos, tais
15 células hospedeiras ou tais composições, especialmente para
objetivos profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos, como
objetivos profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos.