

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 515**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2007** **E 07821929 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013** **EP 2089432**

54 Título: **Fragmento scFv anti-glicoproteína VI para el tratamiento de la trombosis**

30 Prioridad:

26.10.2006 EP 06291673

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

10.01.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (100.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**JANDROT-PERRUS, MARTINE;
BILLIALD, PHILIPPE y
MUZARD, JULIEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 437 515 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fragmento scFv anti-glicoproteína VI para el tratamiento de la trombosis

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un fragmento variable de cadena sencilla (scFv 9O12.2) dirigido contra la glicoproteína VI humana, constituido por los dominios VH y VL del anticuerpo monoclonal 9O12.2 unidos a través de un péptido (Gly4Ser)₃ y seguido de un marcador "c-myc", representado por SEQ ID NO: 1. La invención también se refiere a variantes funcionales de dicho fragmento scFv 9O12.2 con regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 con cadenas pesada y ligera idénticas, y preferentemente a variantes funcionales humanizadas tales como los fragmentos scFv humanizados representados por SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 47. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican un fragmento scFv de este tipo, a vectores de expresión y a células hospedadoras para producir un fragmento scFv de este tipo, así como a usos terapéuticos de un fragmento scFv de este tipo.

Técnica anterior

15 Los accidentes coronarios y cerebrovasculares agudos son actualmente la primera causa de muerte en el mundo. Además, la incidencia global de recidiva y muerte en el período de 6 meses posteriores al tratamiento, después de un síndrome coronario agudo, sigue siendo del 8-15%. En el caso de síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST, el tratamiento mecánico con angioplastia coronaria e introducción de una endoprótesis vascular es muy eficaz para restaurar urgentemente el flujo de la arteria coronaria, pero no impide una morbilidad/mortalidad en aproximadamente el 15% de los pacientes en los 6 meses siguientes.

20 Los tratamientos trombolíticos, que se basan en asociaciones a largo plazo de fármacos fibrinolíticos, anticoagulantes y antiagregación, proporcionan unos resultados aún menos alentadores. En efecto, a pesar de las mejoras en el tratamiento médico de la trombosis, la morbilidad/mortalidad a los 6 meses es similar a la observada para el síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST.

25 En cuanto a los accidentes cerebrovasculares isquémicos, los tratamientos siguen siendo muy limitados debido, en general, a una atención médica con retraso de la mayoría de los pacientes y al riesgo hemorrágico de los tratamientos antitrombóticos disponibles actualmente.

Por ello, existe una auténtica necesidad clínica apremiante de mejorar los tratamientos de las enfermedades cardiovasculares y, en especial, de nuevas moléculas con características mejoradas en comparación con las moléculas disponibles, en particular de moléculas con un efecto hemorrágico reducido.

30 Las interacciones entre plaquetas-colágeno son decisivas en la aparición de una trombosis arterial aguda y en la remodelación vascular posttrombótica. Se ha mostrado en animales que la glicoproteína VI (GPVI), el receptor principal para la activación de las plaquetas a través de colágeno, tiene una función en la trombosis experimental, la remodelación vascular, la aterotrombosis y la isquemia miocárdica aguda.

35 Al contrario que los antagonistas de la integrina $\alpha IIb\beta 3$, que se utilizan actualmente en el tratamiento de la trombosis e inhiben la fase de activación final de las plaquetas, la GPVI está implicada en la fase de activación inicial de las plaquetas y, por lo tanto, los antagonistas de GPVI deben evitar no solo la agregación de plaquetas, sino también la liberación de agonistas secundarios y la secreción de factores de crecimiento y de citocinas que da como resultado el desarrollo de lesiones vasculares. Además, un déficit de GPVI no está asociado con un riesgo hemorrágico elevado, lo que constituye una característica decisiva para la seguridad del paciente. Por último, la expresión de GPVI se limita a las plaquetas, y por lo tanto representa una diana perfectamente específica para el tratamiento anti-trombosis.

Por ello, los antagonistas de GPVI deben ser eficaces para prevenir específica y eficazmente la trombosis primaria o secundaria, a la vez que implican solo un riesgo hemorrágico bajo.

45 Se han generado diversos tipos de antagonistas potenciales de GPVI. En un método, se ha generado una proteína recombinante soluble de GPVI, que es una proteína de fusión entre el dominio extracelular de GPVI y el dominio Fc de Ig humana (véase, por ejemplo, el documento WO 01/00810 (1) y WO 03/008454 (2)). Por tanto, la proteína GPVI recombinante soluble compite con la GPVI de las plaquetas en la unión al colágeno. Unos resultados alentadores se obtuvieron en primer lugar con esta proteína GPVI soluble en un modelo de ratón de trombosis (3), pero estos resultados no se confirmaron (4). Además, este método implica desventajas estructurales, funcionales y farmacológicas. En primer lugar, este compuesto es una proteína de peso molecular elevado (~160 kDa), cuya semivida se espera que sea corta. Puesto que GPVI contiene al menos un sitio de escisión para proteasas, se tiene que considerar la hidrólisis de la proteína GPVI-Fc soluble recombinante. Cuando se une al colágeno, la proteína expondrá su dominio Fc a la corriente sanguínea. Las plaquetas humanas (pero no las plaquetas de ratones) y los leucocitos expresan el receptor de baja afinidad de Fc (Fc γ RIIA) en su superficie. La reticulación del Fc γ RIIA de las plaquetas con GPVI-Fc inmovilizada es susceptible de activar las plaquetas y, por lo tanto, de tener un efecto opuesto al esperado. El momento y la dosis con la que se debe administrar la proteína, también causan problemas.

Una vez unidas al colágeno, las plaquetas se activan de forma rápida e irreversible. Por lo tanto, para ser eficaz, GPVI-Fc se tiene que administrar antes de la activación de las plaquetas, es decir, antes del evento trombótico, una situación poco frecuente en la medicina actual. Por otra parte, la cantidad de proteína que debe ser administrada variará en función del tamaño y la naturaleza de la lesión vascular, un parámetro imposible de predecir.

5 Muchos otros han tratado de desarrollar anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra la GPVI humana. Por ejemplo, en los documentos EP 1224942 (5) y EP 1228768 (6) se describe un anticuerpo monoclonal anti-GPVI, JAQ1, que se une específicamente a la GPVI de ratón, para el tratamiento de la enfermedad trombótica. El anticuerpo JAQ1 induce la internalización irreversible del receptor de GPVI en las plaquetas de ratón.

10 El documento EP1538165 (7) describe otro anticuerpo monoclonal anti-GPVI, hGP 5C4, cuyo fragmento Fab tenía unos efectos inhibitorios notables sobre las principales funciones fisiológicas de las plaquetas inducidas por la estimulación con colágeno: la estimulación de parámetros de la activación fisiológica mediados por colágeno, PAC-1 y CD 62P-selectina estaba completamente obstaculizada por Fab hGP 5C4, y Fab hGP 5C4 inhibía fuertemente la agregación plaquetaria humana *ex vivo* sin ninguna actividad intrínseca.

15 El documento WO 2005/111083 (8) describe 4 anticuerpos monoclonales anti-GPVI, OM1, OM2, OM3 y OM4, que inhibían la unión de GPVI al colágeno, la secreción inducida por colágeno y la formación de tromboxano A2 (TXA2) *in vitro*, así como la agregación de plaquetas inducida por colágeno *ex vivo*, después de una inyección intravenosa a monos *Cynomolgus*. OM4 también parece inhibir la formación de trombos en un modelo de trombosis en rata.

20 El documento WO 01/00810 (1) también describe diversos anticuerpos monoclonales anti-GPVI, denominados 7I20.2, 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.3, 7H4.6, 9O12.2, 7H14.1 y 9E18.2, así como varios fragmentos scFv denominados A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 y D11. Algunos de estos anticuerpos y fragmentos scFv inhibían la unión de GPVI a colágeno, incluyendo los anticuerpos 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.3, 7H4.6 y 9O12.2, y los fragmentos scFv A10, A4, C10, B4, C3 y D11.

25 Además, se encontraron fragmentos Fab 9O12.2 que bloqueaban completamente la agregación y la secreción plaquetaria inducida por colágeno, al inhibir la actividad procoagulante de las plaquetas estimuladas con colágeno y la adhesión de las plaquetas al colágeno en condiciones estáticas, al impedir la adhesión plaquetaria y al evitar la formación de trombos en condiciones de flujo arterial (9).

30 Sin embargo, ninguno de los anticuerpos anti-GPVI conocidos en la actualidad ha mostrado ser realmente eficaz *in vivo* en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares que implican agregación plaquetaria, tales como la trombosis arterial y venosa, la reestenosis, el síndrome coronario agudo, y los accidentes cerebrovasculares debidos a aterosclerosis. Hasta hace poco, los diferentes anticuerpos anti-GPVI que han sido descritos, no parecían adecuados para el desarrollo de un agente antitrombótico para uso médico en humanos. Solo se han descrito unos pocos anticuerpos que tienen propiedades inhibitorias. Este es el caso de JAQ1 que se dirige a GPVI de ratón y no tiene reacciones cruzadas con GPVI humana (10). Los scFvs humanos dirigidos a GPVI humana también se ha descrito que son inhibidores (11, 12), pero su afinidad parece ser baja. Muy recientemente, se han caracterizado nuevos anticuerpos inhibidores con una afinidad adecuada hacia GPVI humana (13) y se ha propuesto su desarrollo como herramientas terapéuticas.

35 Sin embargo, la reticulación de GPVI en la superficie de las plaquetas a través de un ligando divalente o multivalente da como resultado la activación de las plaquetas. Este es el caso de las IgGs 9O12.2 que activan las plaquetas a través de la dimerización de GPVI y a través de la reticulación de GPVI con el receptor de baja afinidad de Fc (FcγRIIA) (9). Fab₂ también activa las plaquetas a través de la dimerización de GPVI (9). Por el contrario, los fragmentos de Fab 9O12.2 monovalentes son inhibidores. Sin embargo, estos fragmentos no se podían utilizar en la terapéutica debido a su tamaño y a su origen animal que los volvía inmunogénicos en pacientes humanos.

40 Por lo tanto todavía existe una necesidad de un antagonista neutralizante de GPVI eficaz, que pueda inhibir con gran eficacia la fase inicial de la agregación plaquetaria, con un bajo riesgo hemorrágico, así como un efecto inmunogénico bajo.

Descripción de la invención

45 A partir del hibridoma del anticuerpo monoclonal 9O12.2 anti-GPVI, los inventores han generado un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) 9O12.2 que tiene la ventaja de contener el motivo inhibitorio funcional en un fragmento de tamaño reducido y sin ningún dominio constante inmunogénico (CH₁ y CL). El scFv es el material de partida para producir fragmentos con tolerancia mejorada y estabilidad inmune con el fin de obtener un formato adaptado al uso terapéutico.

50 Métodos tecnológicos para diseñar tales fragmentos han sido descritos previamente con detalle, sin embargo, hay muchas dificultades que superar haciendo de cada estructura artificial de scFv un caso concreto. Estas dificultades incluyen la clonación de los genes V del anticuerpo evitando las transcripciones aberrantes (14), la identificación de un enlazador bien adaptado para un plegamiento correcto, la asociación de los dominios V en un scFv monómero y, finalmente, la selección de un sistema de expresión procariota que permita la expresión del scFv en una forma soluble funcional.

La invención se refiere por tanto a un fragmento variable de cadena sencilla, dirigido contra una glicoproteína VI humana, que comprende:

- un dominio VH que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 constituidas por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4,
- 5 - un enlazador peptídico, y
- un dominio VL que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 constituidas por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7,

10 en el que las regiones armazón de los dominios VH y VL se han sustituido por dominios VH y VL que tienen regiones armazón de un anticuerpo humano, en donde dicho fragmento variable de cadena sencilla humanizado tiene una afinidad superior hacia GPVI-Fc, en comparación con la del Fab de ratón correspondiente que es $4,5 \cdot 10^{-9}$ M, tal como se determina por resonancia de plasmones superficiales.

En una realización preferida, dicho fragmento scFv de acuerdo con la invención comprende además un marcador peptídico, útil para la purificación y, opcionalmente, un espaciador peptídico corto entre el fragmento scFv central (que comprende los dominios VL y VH y el enlazador péptido) y el marcador peptídico.

15 Un anticuerpo es, en términos generales, una molécula en forma de Y, compuesta por dos cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas cadenas "pesada" y "ligera", estando constituido un anticuerpo por dos cadenas ligeras y dos pesadas unidas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por un dominio variable ("dominio VH") y 3 dominios constantes (dominios "CH1", "CH2" y "CH3"), mientras que cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable ("dominio VL") y un dominio constante ("dominio CL").

20 Un "fragmento variable de cadena sencilla" o "fragmento scFv" se refiere a un polipéptido sencillo plegado que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, enlazados a través de una molécula enlazadora. En un fragmento scFv de este tipo, los dominios V_H y V_L pueden estar ya sea en el orden V_H – enlazador – V_L o V_L – enlazador – V_H . Además de facilitar su producción, un fragmento scFv puede contener una molécula marcadora unida al scFv a través de un espaciador. Un fragmento scFv comprende por lo tanto los dominios V_H y V_L implicados en el reconocimiento del antígeno, pero no los dominios constantes inmunogénicos del anticuerpo correspondiente.

25 Además, cada dominio variable (dominio VH o VL) se compone de 4 "regiones armazón" (FR1, FR2, FR3 y FR4), que muestran menos variabilidad entre los anticuerpos y que están implicadas en la formación de las láminas β que forman el armazón estructural del dominio variable, y de 3 regiones hipervariables comúnmente denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" 1, 2 y 3 (CDR1, CDR2, CDR3), que se corresponden a 3 bucles yuxtapuestos en el dominio variable plegado en el borde de cada lámina β . Las 3 regiones CDRs son cruciales para determinar la especificidad de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo ya que son la parte del dominio variable que está principalmente en contacto con el antígeno, especialmente la región CDR3 de cada cadena, que se corresponde con la región reordenada de las cadenas pesada y ligera y es incluso más variable y está más directamente en contacto con el antígeno específico.

35 Por lo tanto, la invención abarca todas las variantes funcionales de scFv 9O12.2 que conservan regiones CDRs idénticas. Los datos de las regiones CDRs de los fragmentos scFv 9O12.2 se presentan en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1. Regiones CDRs de scFv 9O12.2. Las regiones CDRs se identificaron empleando la nomenclatura de Kabat y Chotia (15, 16)

CDR	Posición en scFv 9O12.2 (aa)	Secuencia
VH CDR1	26-35	GYTFTSYNMH (SEQ ID NO: 2)
VH CDR2	50-66	GIYPGNGDTSFNQKFKG (SEQ ID NO: 3)
VH CDR3	99-109	GTVVGDWYFDV (SEQ ID NO: 4)
VL CDR1	159-174	RSSQSLENSNGNTYLN (SEQ ID NO: 5)
VL CDR2	190-196	RVSNRFS (SEQ ID NO: 6)
VL CDR3	229-237	LQLTHVPWT (SEQ ID NO: 7)

40 Por "enlazador peptídico" se entiende un péptido flexible que permite un plegamiento apropiado del fragmento scFv, es decir, un plegamiento apropiado de los dominios VH y VL y su capacidad para reunirlos. Además, un enlazador peptídico de este tipo debe permitir el plegamiento en una unidad funcional monómera. Cuando el scFv se ensambla en la orientación de VH a VL (V_H – enlazador – V_L), un scFv con un enlazador de 3 a 12 residuos no puede plegarse

en un dominio Fv funcional y en su lugar se asocia con una segunda molécula para formar un dímero bivalente. La reducción a menos de 3 residuos conduce a trímeros. En este caso, un enlazador adecuado debe tener por lo tanto al menos 12 aminoácidos y preferiblemente menos de 25 aminoácidos, preferentemente entre 14-18, 14-16 o 15 aminoácidos, y debería comprender preferiblemente un alto porcentaje de residuos de glicina, preferiblemente al menos 50%. Ejemplos de enlazadores peptídicos adecuados incluyen péptidos (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 8), G₄IAPSMVG₄S (SEQ ID NO: 9), G₄KVEGAG₅S (SEQ ID NO: 10), G₄SMKSHDG₄S (SEQ ID NO: 11), G₄NLITIVG₄S (SEQ ID NO: 12), G₄VVPSLG₄S (SEQ ID NO: 13) y G₂EKSIPG₄S (SEQ ID NO: 14). Cuando el scFv se produce con la orientación de VL a VH (V_L- enlazador - V_H), la distancia entre el extremo C-terminal de VL y el extremo N-terminal de VH es ligeramente mayor que entre el extremo C-terminal de VH y el extremo N-terminal de VL (39-43 Å frente a 30-34 Å). Por lo tanto, un enlazador con 18 residuos de aminoácidos es el tamaño mínimo de la secuencia que se puede utilizar. Un enlazador peptídico adecuado debe tener entonces entre 18-25 aa, preferentemente entre 18-21 aa. Un ejemplo de un enlazador adecuado es el enlazador con secuencia GSTSGSGKSSESGSGSTKG (SEQ ID NO: 15).

Por "marcador peptídico" se entiende un péptido de 5-15 aminoácidos para el que están disponibles anticuerpos específicos. Aunque es opcional en un fragmento scFv de acuerdo con la invención, un marcador peptídico de este tipo insertado en el extremo C-terminal del fragmento scFv, permite facilitar la purificación del fragmento scFv después de la producción recombinante. De hecho, el marcador peptídico proporciona a la proteína una afinidad específica en la unión que no tendría lugar de otra manera, lo que permite una purificación más fácil empleando cromatografía. Ejemplos de marcadores peptídicos adecuados incluyen un marcador His6 (HHHHHH, SEQ ID NO: 16), que tiene afinidad hacia los iones de níquel y por lo tanto se puede purificar utilizando una columna cromatográfica que contiene iones de níquel, o péptidos epítopos con alta afinidad hacia su anticuerpo específico y que por ello se pueden purificar usando una columna que contiene un anticuerpo inmovilizado dirigido contra el péptido, tal como un marcador c-myc (EQKLISEEDLN, SEQ ID NO: 17), un marcador HA (YPYDVPDYA, SEQ ID NO: 18), un marcador Flag (DYKDDDDK, SEQ ID NO: 19), un marcador de proteína C (EDQVDPRLIDGK, SEQ ID NO: 20), un marcador Tag-100 (EETARFQPGYRS, SEQ ID NO: 21), un marcador de epítipo V5 (GKPIPNLLGLDST, SEQ ID NO: 22), un marcador VSV-G (YTDIEMNRLGK, SEQ ID NO: 23) o un marcador Xpress (DLYDDDDK, SEQ ID NO: 24).

Por "espaciador peptídico corto" se entiende un péptido de 1-15 aminoácidos, preferiblemente 1-12 o 1-10 aminoácidos, por ejemplo, 8 aminoácidos. Tal espaciador peptídico está destinado a separar la parte scFv verdadera (dominios VH y VL separados por un enlazador peptídico) del marcador peptídico opcional. No es necesario en un fragmento scFv de acuerdo con la invención, en particular cuando no hay ningún marcador peptídico, pero tampoco cuando se incluye un marcador peptídico. De hecho, un marcador peptídico se puede fusionar directamente con el dominio VH o VL. Sin embargo, un espaciador peptídico corto de 1-12 aminoácidos puede ser útil. Por ejemplo, en el fragmento scFv 9O12.2, se ha empleado un espaciador peptídico de 8 aminoácidos de secuencia RSRVTVSS (SEQ ID NO: 25).

En una realización preferida, la invención se refiere a un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) dirigido contra la glicoproteína VI humana, que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos el 97%, al menos 98%, al menos 98,5%, al menos 99%, al menos 99,5%, al menos 99,6%, al menos 99,7%, al menos 99,8% de identidad con SEQ ID NO: 1, en la que los aminoácidos 26 a 35, 50 a 66, 99 a 109, 159 a 174, 190 a 196 y 229 a 237 de dicha secuencia de 266 aminoácidos están constituidos por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente. Tales variantes funcionales de scFv 9O12.2 no solo conservan las regiones CDRs idénticas, sino que también tienen un alto porcentaje de identidad con la secuencia de aminoácidos de scFv 9O12.2. En una realización particular, la invención se refiere a un fragmento variable de cadena sencilla que comprende o consiste en SEQ ID NO: 1.

Sin embargo, las regiones armazón se mutan para generar un fragmento scFv quimérico, en particular humanizado, dirigido contra la glicoproteína VI humana. Con respecto a un anticuerpo de referencia o a un fragmento de anticuerpo de una especie dada, en un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo "quimérico" correspondiente, en el que las regiones armazón se han sustituido por regiones armazón correspondientes de otra especie. Más particularmente, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con regiones CDRs idénticas en las que las regiones armazón se han sustituido por regiones armazón humanas.

Los inventores han obtenido el fragmento scFv 9O12.2 a partir del anticuerpo monoclonal de ratón 9O12.2, y por lo tanto tiene las regiones armazón de ratón. Sin embargo, para reducir el efecto inmunógeno de la inyección de este fragmento en pacientes humanos, puede ser deseable un fragmento scFv humanizado, en el que las regiones armazón de de ratón se han sustituido por las regiones armazón humanas.

Se han sugerido diversos métodos posibles para humanizar los dominios V del anticuerpo. Estos incluyen los injertos de CDR, la reconstrucción de dominios V o el análisis informático predictivo que explora una diversidad de sustituciones en una secuencia dada de la cadena V, con el fin de reducir la inmunogenicidad a la vez que se mantiene la especificidad del antígeno y la afinidad de la molécula original (17-19). Ninguno de estos métodos es sencillo y todos dan frecuentemente como resultado una especificidad y/o una afinidad disminuida (20-23).

A pesar de estas dificultades, los inventores han generado un primer fragmento scFv humanizado en el que los dominios V_H y V_L del fragmento scFv 9O12.2 de ratón, que se corresponden a los aminoácidos número 1-120 y 136-266 de SEQ ID NO: 1, se han sustituido respectivamente por dominios de V_H y V_L humanizados, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, dando como resultado un fragmento scFv humanizado con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28 (hscFv 9O12.2 (1), véase la figura 14).

En una primera realización preferida, la invención se refiere por lo tanto a un fragmento variable de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las regiones armazón de los dominios V_H y V_L se han sustituido por dominios V_H y V_L que tienen regiones armazón de un anticuerpo humano. En particular, dichos dominios V_H y V_L se pueden reemplazar respectivamente por SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27. Más precisamente, cuando un fragmento scFv que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 1, está humanizado, puede dar lugar a un primer fragmento scFv humanizado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 (hscFv 9O12.2 (1), véase la figura 14).

Para generar un fragmento scFv humanizado de este tipo, se puede utilizar una tecnología bien conocida denominada injertar CDRs, que implica la selección de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un fragmento scFv donante, e injertarlas en una región armazón de un fragmento scFv humano con estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/45322 (24), WO 87/02671 (25); US5.859.205 (26); US5.585.089 (27); US4.816.567 (28); EP0173494 (29) y las referencias 20-21 y 30-31) o la realización de búsquedas en bases de datos para identificar candidatos potenciales. En un método típico con la ayuda del modelado por ordenador y la comparación con secuencias de la línea germinal humana, los bucles que se unen al antígeno del anticuerpo monoclonal que se va a humanizar se superponen sobre las regiones armazón que se ajustan mejor. El método de humanizar el scFv 9O12.2 ha sido adaptado a partir de la tecnología de injertar CDRs (32). Las CDRs del anticuerpo 9O12.2 de ratón se han injertado en una región armazón de la cadena variable humana. La elección del anticuerpo humano se ha realizado usando los siguientes criterios: se ha elucidado la estructura cristalográfica (1VGE en genoteca de pdb); los dominios variables del anticuerpo humano 1VGE presentan un alto grado de homología de secuencia con los dominios variables de 9O12.2 (V_H 60,6%; V_L 55,4%); se realizó la comparación de la estructura de los datos cristalográficos del anticuerpo humano candidato 1VGE y del modelo de los dominios variables de 9O12.2 y nos permitió validar la elección del entramado aceptor humano 1VGE. Esta estrategia minimiza el riesgo de disminuir la estabilidad de la interacción entre los dominios V_H y V_L , conservando al mismo tiempo el entramado necesario para el plegamiento correcto de las CDRs, conservando una alta afinidad hacia el antígeno. El anticuerpo humano 1VGE seleccionado basándose en estos análisis, permitió la construcción de scFv 9O12.2 humanizado. Por razones estructurales, no se mutaron 10 residuos después de CDR H2. Se mejoró la secuencia de nucleótidos que codificaba el scFv 9O12.2 humanizado. En primer lugar, se introdujeron sitios de restricción entre las regiones CDRs para hacer posible adaptaciones para obtener unas características de unión óptimas. La mejora se realizó a continuación empleando el uso de codones bacterianos con el fin de expresar el scFv humanizado en el sistema de expresión procarionta de *E. coli*. Dicho método dio lugar a un fragmento scFv 9O12.2 humanizado en el que los dominios V_H y V_L del fragmento scFv 9O12.2 de ratón, que se corresponde a los aminoácidos número 1-120 y 136-266 de SEQ ID NO: 1, respectivamente, se han sustituido por SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, respectivamente, es decir, un fragmento scFv 9O12.2 humanizado que consiste en SEQ ID NO: 28. En una realización preferida de un fragmento scFv humanizado de acuerdo con la invención, dicho fragmento scFv comprende o consiste por lo tanto en SEQ ID NO: 28.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos con este primer fragmento scFv humanizado, este fragmento no era óptimo para la producción en bacterias y se obtuvo un segundo fragmento scFv humanizado mejorado adicional (hscFv 9O12.2(2)) a partir de scFv 9O12.2(1). Resumiendo, para las regiones FR1 y FR2 de V_L , la identidad con las regiones armazón 1 y 2 de 1VGE era baja y las FR1 y FR2 de V_L de 9O12 original se conservaron de este modo en la segunda construcción de scFv humanizado. Otros refinamientos se realizaron basándose en la revisión a fondo del modelo (véase el Ejemplo 2 para más detalles).

Por tanto, en una segunda realización preferida, la invención se refiere a un fragmento variable de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las regiones armazón de los dominios V_H y V_L se han sustituido por los dominios V_H y V_L que tienen regiones armazón de un anticuerpo humano. En particular, dichos dominios V_H y V_L se pueden sustituir respectivamente por SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 46. Más precisamente, cuando un fragmento scFv que comprende o consiste en SEQ ID NO: 1 se humaniza, puede dar preferentemente también como resultado un segundo fragmento scFv humanizado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 47 (hscFv 9O12.2 (2), véase la figura 18).

La invención se refiere además a una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento variable de cadena sencilla según la invención, tal y como se ha descrito anteriormente. En una realización particular, cuando dicho fragmento scFv comprende o consiste en SEQ ID NO: 1, dicha secuencia de ácido nucleico puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 29, o en cualquier secuencia de ácido nucleico derivada que codifica SEQ ID NO:1, por ejemplo, como resultado de la degeneración del código genético.

Cuando dicho fragmento scFv está humanizado y los dominios V_H y V_L del fragmento scFv 9O12.2 de ratón, que se corresponden a los aminoácidos número 1-120 y 136-266 de SEQ ID NO: 1, respectivamente, han sido sustituidos por SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, respectivamente, dando como resultado un primer fragmento scFv 9O12.2

humanizado (hscFv 9O12.2(1)), que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28, dicho ácido nucleico puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 30, o cualquier secuencia de ácido nucleico derivada que codifica SEQ ID NO: 28, por ejemplo, como resultado de la degeneración del código genético.

5 Alternativamente, cuando dicho fragmento scFv está humanizado y los dominios V_H y V_L del fragmento scFv 9O12.2 de ratón, que se corresponden a los aminoácidos número 1-120 y 136-266 47, respectivamente, dando como resultado un segundo fragmento scFv 9O12.2 humanizado (hscFv 9O12.2(2)), que comprende o consiste en SEQ ID NO: 47, dicho ácido nucleico puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 50 (véase la figura 18C), o cualquier secuencia de ácido nucleico derivada que codifica SEQ ID NO: 47, por ejemplo, como resultado de la degeneración del código genético.

10 La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico tal y como se ha descrito. Tal vector de expresión comprende también secuencias de ácido nucleico apropiadas, necesarias para la expresión de la secuencia que codifica scFv ligado funcionalmente en una célula hospedadora particular. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariontes incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión a ribosomas y posiblemente otras secuencias. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, potenciadores y señales de terminación y de poliadenilación en una célula hospedadora.

15 Un vector de expresión de este tipo también puede contener una secuencia líder que dirige el scFv expresado a un compartimento celular particular, por ejemplo, una secuencia que dirige una expresión membranal o una secreción del fragmento scFv, o que dirige su expresión en el periplasma de bacterias. También puede contener bajo el control del mismo promotor, un gen de selección cuya expresión se puede detectar fácilmente para seleccionar células hospedadoras recombinantes, transformadas con el vector de expresión. Los genes de selección adecuados incluyen genes resistentes a un antibiótico en particular, genes fluorescentes o cualquier otro gen cuya expresión se puede controlar fácilmente de forma conocida por una persona experta en la técnica.

20 La invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende un vector de expresión tal y como se ha descrito anteriormente. Una célula hospedadora recombinante de este tipo se puede obtener mediante la transfección o la transformación de una célula hospedadora con un vector de expresión de acuerdo con la invención.

25 Tal célula hospedadora puede ser procarionte o eucariota. Las células hospedadoras procariontes adecuadas incluyen bacterias gram-positivas y gram-negativas. Entre las bacterias gram-negativas, una célula hospedadora preferida está representada por *E. coli*. Para el uso en bacterias, el vector de expresión puede contener preferiblemente una secuencia líder que dirige la expresión del fragmento scFv al periplasma bacteriano, que se corresponde con el espacio entre la membrana plasmática y la membrana externa de las bacterias gram-negativas o entre la membrana plasmática y la capa de peptidoglicanos (pared celular) de las bacterias gram-positivas. Las secuencias adecuadas que dirigen la expresión de un polipéptido al periplasma bacteriano incluyen los péptidos señal o secuencias líder ompA, ompF, ompT, LamB, β-lactamasa, cp VIII de M13, pelB, malE o phoA. En una realización particular, dicha secuencia líder es pelB.

30 Alternativamente, se puede utilizar una célula eucariota, en particular una célula de mamífero. De hecho, esto puede permitir generar directamente un fragmento scFv glicosilado. Líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles, en particular de la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y una variedad de otras líneas celulares. Como células eucariotas, también se pueden utilizar las células de levadura. Para obtener un patrón de glicosilación próximo a un patrón de glicosilación humano natural, se puede recurrir a líneas de células humanas como células hospedadoras. Alternativamente, las células de levadura de *Pichia pastoris*, un organismo robusto utilizado generalmente en los procesos de fermentación, que se puede dejar crecer hasta tener una alta densidad celular en un medio de crecimiento definido químicamente, se han modificado eliminando en primer lugar las rutas de glicosilación endógenas de la levadura, a la vez que se introducía secuencialmente por modificación genética en el organismo, una ruta de glicosilación sintética *in vivo* que permite que la levadura produzca un N-glicano humano complejo, GlcNAc2Man3GlcNAc2, *in vivo* (véanse los documentos EP1297172 (33), EP1522590 (34), y las referencias 35, 36). Tales células de levadura modificadas con una ruta de glicosilación humanizada son capaces de secretar una glicoproteína humana con N-glicosilación compleja uniforme.

50 La invención se refiere también a un método para preparar un fragmento variable de cadena sencilla de acuerdo con la invención, tal y como se ha descrito anteriormente, que comprende:

- a) cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la invención tal y como se ha descrito anteriormente y
- 55 b) purificar dicho fragmento variable de cadena sencilla.

Los protocolos y los medios para el cultivo de células hospedadoras representan procedimientos de rutina y son fácilmente asequibles para cualquier persona experta en la técnica. En cuanto a la purificación del fragmento scFv obtenido, se puede llevar a cabo utilizando tecnologías bien conocidas, que incluyen la cromatografía de afinidad

(por ejemplo, utilizando proteína L-sefarosa) o la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de hidroxapatita, la electroforesis en gel, la diálisis, etc. Más precisamente, cuando el fragmento scFv comprende un marcador His6 o un marcador de epítipo tal y como se ha descrito anteriormente, HPLC con columnas de iones de níquel o con columnas que contienen anticuerpos específicos inmovilizados.

- 5 La invención se refiere además a un fragmento variable de cadena sencilla de acuerdo con la invención tal y como se ha descrito anteriormente, como medicamento.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica, que comprende un fragmento variable de cadena sencilla de acuerdo con la invención, tal y como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 Más precisamente, la invención también se refiere al uso de un fragmento variable de cadena sencilla de acuerdo con la invención tal y como se ha descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad cardiovascular seleccionada entre trombosis arterial y venosa, reestenosis, síndrome coronario agudo y accidentes cerebrovasculares debidos a aterosclerosis. En una realización preferida de un uso de este tipo, dicha enfermedad cardiovascular es la trombosis.
- 15 Habiendo descrito en general esta invención, se puede obtener una comprensión adicional de las características y las ventajas de la invención haciendo referencia a ciertos ejemplos y figuras específicos que se proporcionan en este documento solo con fines de ilustración y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique lo contrario.

Descripción de las figuras

- 20 Figura 1. Descripción esquemática del método utilizado para la construcción del vector de expresión de scFv 9O12.2. Etapa 1: amplificación con PCR del segmento VH del anticuerpo monoclonal 9O12.2.2 utilizando los cebadores T7 y Link9O12.2VHFor y del segmento VL usando los cebadores Link9O12.2VLRev y 9O12.2mycFor. Etapa 2: amplificación con PCR de solapamiento utilizando los cebadores pSWRev y 9O12.2mycFor seguido de amplificación con PCR usando los cebadores pSWRev y pSWFor, generando de este modo un ácido nucleico que
- 25 codifica scFv 9O12.2. Etapa 3: purificación del ADN de los productos de la PCR. Etapa 4: digestión del ADN purificado utilizando las enzimas de restricción PstI y XhoI. Etapa 5: clonación del producto digerido en el vector de expresión pSW1. Etapa 6: secuenciación de la construcción obtenida.

- 30 Figura 2. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida de scFv 9O12.2 clonadas en el plásmido pSWscFv9O12.2myc. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida de scFv 9O12.2 clonadas entre los sitios de restricción PstI y XhoI en el vector de expresión pSW1. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los cebadores usados para la amplificación con PCR o que codifican el péptido enlazador, se muestran en cursiva. La secuencia de aminoácidos deducida de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de VH y VL está subrayada. Se muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la señal c-myc.

- 35 Figura 3. Modelo tridimensional del scFv9O12.2. Modelo de los dominios que se unen al antígeno de 9O12.2.2 (vista lateral). Se indican las CDRs.

- 40 Figura 4. Análisis de extractos periplásmicos bacterianos mediante citometría de flujo sobre plaquetas humanas. Extractos periplásmicos bacterianos de bacterias recombinantes inducidas, transformadas con un plásmido que codificaba un scFv-myc irrelevante o el plásmido pSW scFv9O12.2-myc, se incubaron con plaquetas humanas. La unión de los scFvs se analizó utilizando un anticuerpo anti-c-myc acoplado a FITC. A: scFv irrelevante, B: scFv 9O12.2. Panel izquierdo: dispersión delantera frente a lateral, panel derecho: histograma de la fluorescencia.

- 45 Figura 5. Producción periplásmica y purificación por cromatografía de afinidad de una proteína recombinante a partir de cultivos de pSW1-scFv9O12.2myc en *E. coli* Topp1. (A): SDS-PAGE teñido con Azul Brillante de Coomassie. (B): análisis por transferencia Western con IgG anti-c-myc. Pista 1, patrones de la masa molecular; pista 2, fracción periplásmica de bacterias inducidas cargadas en una columna de GPVI-sefarosa; pista 3, fracción que fluye a través de la columna de GPVI-sefarosa; pista 4, fracción eluida de la columna de GPVI-sefarosa.

- Figura 6. Cromatografía de exclusión por tamaño de scFv nativo. La cromatografía de exclusión por tamaño de scFv 9O12.2 purificado por afinidad, se realizó en una columna Superdex 75 HR 10/30 calibrada con patrones de la masa molecular conocidos.

- 50 Figura 7. Unión de scFv 9O12.2 purificado a GPVI-Fc inmovilizada. scFv 9O012.2 (oscuro) o scFv irrelevante (símbolo gris) se incubaron en placas recubiertas con GPVI-Fc y se detectaron usando anticuerpo anti-c-myc acoplado a HRP (A): unión isoterma. (B): unión de scFv 9O12.2 ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en competición con cantidades crecientes de IgG 9O12.2.

- 55 Figura 8. Análisis por resonancia de plasmones superficiales de scFv 9O12.2 que se une a GPVI-Fc inmovilizada. La afinidad de scFv 9O12.2 hacia GPVI-Fc es alta con una K_D en el orden de $2,5 \times 10^{-9}$ M. Las K_D de IgG y Fab 9O12.2.2 para GPVI-Fc también están en el orden nanomolar ($6,5 \times 10^{-9}$ M y $4,5 \times 10^{-9}$ M, respectivamente).

Figura 9. Inhibición de la unión de GPVI a colágeno inmovilizado. GPVI-Fc se incubó sobre colágeno inmovilizado en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos: scFv 9012.2 (triángulo) o pFab (cuadrado) (A): 2 µg de GPVI-Fc; (B): 4 µg de GPVI-Fc. La GPVI-Fc unida se detectó usando una IgG anti-Fc acoplada a HRP.

5 Figura 10. Unión de scFv 9012.2 purificado a plaquetas: análisis por citometría de flujo. Las plaquetas lavadas se incubaron con un scFv irrelevante (parte superior) o cantidades decrecientes de scFv 9012.2 (100, 50 y 25 mM). La unión de los scFvs se analizó utilizando una IgG anti-c-myc acoplada a FITC.

10 Figura 11. Efecto de scFv 9012.2 sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno. Plaquetas humanas lavadas (2×10^8 mL) se incubaron con un scFv irrelevante (curva inferior), Fab 9012.2 (25 µg/ml) (curva superior), scFv 9012.2 monómero aislado (negro) durante 5 min a 37°C y se añadió el colágeno. La agregación se analizó a 37°C en condiciones de agitación y se registró el cambio en la transmisión de la luz.

15 Figura 12. Efecto de m scFv 9012 sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno en condiciones de flujo arterial. Sangre completa (5 mL) se marcó con fluorocromo DIOC-6 permeable a las células, las plaquetas aparecen en blanco en la foto, y se incubó con PBS (A) o fragmentos de anticuerpos a $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (B-D), y a continuación se perfundió sobre cubreobjetos recubiertos con colágeno en una cámara de flujo a $1\ 500 \text{ s}^{-1}$. La formación de agregados plaquetarios unidos a la matriz de colágeno se registró con un microscopio fluorescente. (B) scFv 9C2 irrelevante. (C) m scFv9012. (D) Fab 9012.

20 Figura 13. Efecto de m scFv 9012 sobre la generación de trombina inducida por colágeno en PRP. El plasma rico en plaquetas (PRP) se preincubó con vehículo (curva negra) o $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Fab9012 (gris oscuro) o m scFv 9012 (gris claro) antes de añadir el colágeno ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). La generación de trombina se inició añadiendo factor tisular 0,5 pM y CaCl_2 16,6 mM. La concentración de trombina se determinó empleando un sustrato fluorescente y se calculó en relación con un calibrador. Las trazas son de un experimento representativo. Los gráficos de barras representan media \pm DE de la fase de latencia y los valores pico ($n=3$) (Las barras que se corresponden a la DE son demasiado pequeñas para ser visibles).

25 Figura 14. Secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos deducida de los dominios VL y VH humanizados y del primer fragmento scFv 9012.2 humanizado (hscFv 9012.2(1)). A. Se muestran los nucleótidos de VH de 9012.2 humanizado (1) (SEQ ID NO: 31) y los aminoácidos (SEQ ID NO: 26). B. Se muestran los nucleótidos de VL de 9012.2 humanizado (1) (SEQ ID NO: 32) y los aminoácidos (SEQ ID NO: 27). C. Se muestran los nucleótidos de hscFv 9012.2(1) humanizado (SEQ ID NO: 30) y los aminoácidos (SEQ ID NO: 28).

30 Figura 15. Caracterización del primer scFv 9012.2 humanizado (hscFv 9012.2(1)). Unión por afinidad a sefarosa y GPVI: La fracción periplásmica de las bacterias recombinantes se cargó en una columna de sefarosa y GPVI. Las proteínas retenidas se analizaron por transferencia Western utilizando una IgG anti-c-myc seguido por anticuerpo anti-ratón acoplado a HRP y revelado por ECL. Se detecta una sola banda con una masa molecular de 28,5 kDa, como se esperaba para el scFv humanizado.

35 Figura 16. Unión de scFv 9012.2 a GPVI-Fc. El primer scFv humanizado purificado (hscFv 9012.2(1), gris oscuro) y m scFv (gris claro) se inyectaron en GPVI-Fc inmovilizada sobre un chip sensorial CM5. Los sensogramas se muestran después de la deducción de la señal en blanco.

40 Figura 17. Unión del primer scFv9012 humanizado (hscFv 9012.2(1)) a plaquetas humanas. Las plaquetas humanas se incubaron con extractos periplásmicos bacterianos. scFv unido a las plaquetas se detectó utilizando anticuerpo anti-c-myc acoplado a FITC. La unión a las plaquetas se analizó en un citómetro de flujo XL Epics Coulter. Un scFv irrelevante se utilizó como testigo negativo (panel superior). El desplazamiento a la derecha del histograma (panel inferior) indica que el scFv 9012.2 humanizado se une a GPVI de plaquetas.

45 Figura 18. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de los dominios VH y VL humanizados y el segundo fragmento scFv 9012.2 humanizado y mejorado (hscFv 9012.2(2)). A. Se muestran los nucleótidos de VH de 9012.2 humanizado (2) (SEQ ID NO: 48) y los aminoácidos (SEQ ID NO: 26). B. Se muestran los nucleótidos de VL de 9012.2 humanizado (2) (SEQ ID NO: 49) y los aminoácidos (SEQ ID NO: 46). C. Se muestran los nucleótidos de hscFv 9012.2(2) humanizados (SEQ ID NO: 50) y los aminoácidos (SEQ ID NO: 47). Los sitios de las enzimas de restricción están en negrita. El enlazador entre los dominios VH y VL está subrayado. Las regiones CDRs están resaltadas en gris.

50 Figura 19. Humanización mejorada de los dominios variables del anticuerpo 9012. Análisis de la secuencia de los dominios V del anticuerpo: 9012 de ratón (m9012); 1VGE; 9012 humanizado (h9012) y 1X9Q. (.) indica residuos idénticos a 9012 de ratón. (-) indica un espacio. Los residuos de los dominios V humanizados que no tienen similitud con 9012 de ratón se muestran en rojo y azul (residuos A_{H71} , K_{H73} , R_{476} , L_{L59} , D_{L60} de acuerdo con la nomenclatura de Kabat). Las CDRs se resaltan en gris.

55 Figura 20. Caracterización del segundo scFv humanizado (hscFv 9012.2(2)). A- Detección con transferencia Western de scFvs recombinantes empleando el anticuerpo anti-c-myc. B- Análisis por citometría de flujo. Las plaquetas humanas se incubaron previamente con fragmentos de anticuerpo durante 30 minutos. La unión de scFvs se detectó empleando anticuerpo anti-c-myc conjugado con FITC.

Ejemplos

Ejemplo 1 Síntesis y actividad un fragmento variable de cadena sencilla scFv 9O12.2 de ratón y un primer fragmento variable de cadena sencilla scFv 9O12.2 humanizado dirigidos contra la glicoproteína VI humana

1.1 Procedimiento experimental

5 1.1.1 Materiales

Medios y soluciones

LB (Luria-Bertani), *DIFCO 402-17*; LB-agar, *DIFCO 445-17*; 2xTY (Triptón-Levadura), *DIFCO 244020*; TES: Tris-HCl 30 mM, EDTA 1 mM, sacarosa al 20%, pH 8,5; PBS: NaCl 0,14 M, KCl 13 mM, KH₂PO₄ 9 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, pH 7,4; BBS: ácido bórico 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6; Ampicilina, *Euromedex UE-0400C*; isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG), *Euromedex EU0008-B*; albúmina de suero bovino (BSA), *Sigma B4287*; IgG anti-c-myc acoplada a FITC, *Sigma F-2047*; desoxirribonucleasa A, aprotinina: *Sigma A-6279*; IgG anti-c-myc acoplada a HRP, *Invitrogen R951-25*; ortofenil diamina (OPD): *Sigma P8787*, Trizol: *Invitrogen*, Horm colágeno tipo I: *Nycomed*, vector de clonación pGEM_T, *Promega*. El plásmido pSW1 se utilizó para la expresión de scFv. 6H8 y 9C2 se utilizaron como scFv no relevante.

15 Secuencias de oligodesoxirribonucleótidos

Los oligodesoxirribonucleótidos utilizados se enumeran en la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2. Oligodesoxirribonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
T7	TAATACGACTCACTAGGGCGAAT	SEQ ID NO: 33
pSWRev	CGGCAGCCGCTGGATTGTTA	SEQ ID NO: 34
pSWFor	CGAGCTTAGCCCTTATAATTCAGATCCTC	SEQ ID NO: 35
Link9012VRev	GGAGGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTG GAGGTGGCGGAAGCGATGTTTTGATGAC CCAAACTCCACT	SEQ ID NO: 36
Link9012VHFor	ACCACCGGATCCGCCTCCGCCTGAGGAG ACGGTGACCGT	SEQ ID NO: 37
9O12.2mycFor	GACCCTCGAGCGTTTGATCTCCAGCTTGGT	SEQ ID NO: 38
9O12.2H3Rev	GGCGACTGGTACTTCGATGTC	SEQ ID NO: 39
9O12.2H2Rev	AAATGGTGACACTTCCTTCAATCA	SEQ ID NO: 40
9O12.2L1For	GTTTTCAAGGCTCTGACTAGACCT	SEQ ID NO: 41
MKC5For	GGATTACAGTTGGTGCAGCATC	SEQ ID NO: 42
MKRevU	GAYATTGTGMTSACMCARWCT	SEQ ID NO: 43
VHFor	CGGGATCCTCTAGACAGTGATARACMG ATGG	SEQ ID NO: 44
VHRev	CGGGATCCTCTAGAGGTSMARCTGCAGSA GTCWGG	SEQ ID NO: 45

Preparación de plaquetas humanas

20 Las plaquetas humanas se prepararon tal como se ha descrito previamente (9).

Citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo de Coulter Epics XL con el programa "simple FITC labelling of platelets program"

Preparación de GPVI-Sefarosa:

Reactivos: CnBr-sefarosa era de Amersham-Pharmacia. GPVI soluble recombinante (GPVI-Fc) se produjo y se purificó en el laboratorio (9).

Método: CnBr-sefarosa (Amersham-Pharmacia) se preparó como indica el proveedor. Se incubó con GPVI-Fc (8 mg/mL de gel en NaHCO₃ 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 8,3) durante 18 h con agitación. El gel se filtró y la concentración de proteínas en el material filtrado se midió para determinar el rendimiento del acoplamiento. Después de una etapa de bloqueo con etanolamina (1 M, pH 8,8) durante dos horas a temperatura ambiente, en la oscuridad con agitación suave, el gel se filtró y se lavó sucesivamente con el tampón de acoplamiento y con acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4. El gel se almacenó a 4°C en PBS que contenía azida de sodio (1%).

1.1.2 Procedimientos

10 Construcción genética de scFv 9O12.2:

Se aisló ARNm a partir de células de hibridoma 9O12.2.2 recién subclonadas que producían la inmunoglobulina G (IgG) 9O12.2.2 dirigida contra GPVI humana. El ADNc que codificaba los dominios variables del anticuerpo se clonaron después de la RT-PCR y el gen de scFv 9O12.2 se creó mediante corte y empalme con PCR, con extensiones solapantes. Un vector de expresión obtenido a partir de pUC19 [vector pSW I (37)] se utilizó para la producción del scFv 9O12. Contiene el promotor LacZ inducible con IPTG, la secuencia líder *peB* y, aguas abajo, el gen que codifica el scFv 9O12.2 fusionado con el marcador c-myc y un gen de resistencia a la ampicilina utilizado para seleccionar las bacterias recombinantes.

El método utilizado para construir el vector de expresión de scFv 9O12.2 se resume en la Figura 1.

Producción del scFv 9O12.2

20 La secuencia líder *peB* permite que el scFv 9O12.2 recombinante se dirija al periplasma de bacterias transformadas con el vector de expresión pSW scFv 9O12.2myc. Las bacterias Topp1[®] (no K12, Rif^r, F^r, proAB, lacI^qΔM15, Tn10, tet^r) (Stratagene, La Jolla, EE.UU.), colonia 55T1, se utiliza para producir el scFv 9O12.2.

* J0: Cultivo en placas de la colonia 55T1 sobre agar LB suplementado con ampicilina (subclonación). Incubación durante una noche a 37°C.

25 * J1: 4 PM: Selección de un clon y el cultivo en 5 mL de LB suplementado con ampicilina. Incubación durante una noche a 37°C con agitación (125 rpm).

30 * J2: 8 AM: Medición de la absorbancia a 600 nm (valor esperado $A_{600nm} = 1,5 \pm 0,1$). Transferencia de 4 mL a 500 mL de 2xTY + ampicilina. Incubación a 37°C con agitación (125 rpm) hasta alcanzar $A_{600nm} 1,5 \pm 0,1$ (~8 h). A continuación, inducción de las bacterias con IPTG 0,8 mM. Incubación durante 16 horas a 16°C con agitación (75 rpm).

35 * J3: extracción de proteínas periplásmicas: las células bacterianas se recogen por centrifugación (3600 g, 20 min a 4°C). El sedimento se resuspende suavemente en 10 mL de tampón TES y se incuba durante 30 min sobre hielo. Las células se someten después a un choque osmótico suave mediante la adición de tampón TES, diluido 1:4. Después de la incubación sobre hielo durante 30 min, el material insoluble se elimina por centrifugación a 15000 g durante 30 min a 4°C. A continuación, se añade desoxirribonucleasa A (50 U) e inhibidor de proteasas (aprotinina 2 g/mL) al material sobrenadante que se corresponde con el extracto de proteínas periplásmicas. Después de ello, la preparación se dializa extensamente frente a PBS a 4°C. Un extracto de proteínas periplásmicas de bacterias que expresan un scFv irrelevante, se prepara de acuerdo con el mismo procedimiento.

40 * J4: Centrifugación a 15000 g durante 30 min a 4°C. El material sobrenadante se recoge y se mide su absorbancia a 280 nm (valor esperado: 1,5 a 3,0). Se toma una muestra para análisis y la preparación (~ 35 mL ± 2,0) se almacena a -20°C.

45 * J5: Escrutinio de los extractos periplásmicos por citometría de flujo: plaquetas humanas lavadas (2×10^7 /mL) se incuban con 100 μL de extracto de proteínas periplásmicas durante 30 min a temperatura ambiente. Se añade la IgG anti-c-myc acoplada a FITC y la incubación continúa durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se prepara un testigo negativo con el anticuerpo anti-c-myc en ausencia de extractos periplásmicos. Las muestras se analizan por citometría de flujo (Coulter Epics XL).

50 * J6: Purificación del scFv 9O12.2 por cromatografía de afinidad en sefarosa acoplada a GPVI. El extracto periplásmico (35 mL) se incuba con 500 μL de GPVI-sefarosa durante 12 h a 4°C y 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se carga en una columna. La fracción que fluye a través se recoge antes de lavar con PBS hasta que $A_{280} nm = 0,001$; la elución se realiza con glicina 0,1 M de pH 3,0 y se recogen fracciones de 400 μL en tubos que contienen 5 μL de Tris 3 M en hielo. La $A_{280} nm$ se mide y las fracciones con $A_{280} nm$ superior a 0,2 se reúnen y se dializan extensamente frente a PBS.

* J7: La muestra se centrifuga a 15000 g durante 30 min. La concentración de proteínas se determina después de la medición de la $A_{280} nm$. El programa informático ProtParam (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) se utiliza para

determinar la Mr teórica de scFv9O12.2myc y su coeficiente de extinción a 280 nm.

Análisis de las proteínas:

5 El análisis de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en bloque en presencia de SDS de acuerdo con Laemmli; mediante inmunotransferencia después de la transferencia de las proteínas a nitrocelulosa, incubación con un anticuerpo anti-c-myc acoplado a HRP y detección utilizando 4-cloro-naftol.

Determinación experimental de la masa

10 La Mr de scFv purificado se determina en un espectrómetro de masas con desorción/ionización láser asistida con matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Voyager DE-PRO; PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA). La solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% y TFA al 0,1% se utiliza como matriz y el espectrómetro se calibra utilizando mezclas de péptidos externos patrones.

Cromatografía de exclusión-difusión por tamaño:

15 La preparación de scFv purificado se determinó mediante cromatografía de difusión y exclusión por tamaño en una columna Superdex 75 HR calibrada con patrones de masa molecular conocida. Una muestra de 200 μ L se inyectó con una tasa de 0,5 mL/min. La detección se controla utilizando un detector de UV a 226 nm. Las fracciones se utilizaron inmediatamente para análisis.

Unión a GPVI soluble recombinante

20 Las placas de microtitulación se recubren con GPVI-Fc (10 μ g/mL, 100 μ L por pocillo) durante una noche a 4°C. Los pocillos se saturan con 100 μ L de BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añaden a los pocillos concentraciones crecientes de scFv 9O12 durante 2 horas. Los scFvs unidos se detectan después de incubación durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-c-myc acoplado a HRP (1/750 en PBS). Después, la solución sustrato (OPD) se añade a los pocillos durante 5 min y se lee la absorbancia a 492 nm. Se realizan dos testigos: el primero utilizando un scFv irrelevante en lugar de scFv 9O12.2 y el segundo omitiendo el recubrimiento con GPVI-Fc. Se realizan cinco lavados con PBS que contiene 0,05% de Tween y 0,1 mg/mL de BSA entre cada etapa intermedia.

25 Construcción del primer fragmento scFv humanizado (hscFv 9O12.2(1))

30 El método de humanizar el scFv 9O12.2 se ha adaptado a partir de la tecnología 9 de injertar CDRs. Las CDRs del anticuerpo 9O12.2 de ratón se han injertado en una región armazón de la cadena variable humana. La elección del anticuerpo humano se ha realizado siguiendo estos criterios: la estructura cristalográfica se ha elucidado (1VGE en genoteca pdb); los dominios variables del anticuerpo humano 1VGE presentan un alto grado de homología de secuencia con los dominios variables de 9O12.2 (VH 60,6%; VL 55,4%); se realizó la comparación estructural de los datos cristalográficos del anticuerpo humano candidato 1VGE y el modelo de los dominios variables de 9O12.2 y nos permitió validar la elección de 1VGE humano como entramado aceptor. Esta estrategia minimiza el riesgo de reducir la estabilidad de la interacción entre los dominios VH y VL, conservando al mismo tiempo el entramado necesario para un plegamiento correcto de la CDR, conservando una alta afinidad hacia el antígeno. El anticuerpo humano 35 1VGE seleccionado basándose en estos análisis, nos permitió construir el scFv 9O12.2 humanizado. La secuencia de nucleótidos que codificaba el scFv 9O12.2 humanizado se mejoró. En primer lugar, se introdujeron sitios de restricción entre regiones CDRs para hacer posibles unos ajustes para mejorar las características de la unión. La mejora se realizó a continuación, mediante el uso de codones bacterianos con el fin de expresar el scFv humanizado en el sistema de expresión procariota de *E. coli*.

40 Más precisamente, en primer lugar construimos un modelo tridimensional de m scFv9O12 *in silico* después de identificar las estructuras cristalinas con secuencias lo más similar posible a los dominios variables de 9O12. Todas esas secuencias eran de origen de ratón. Las cuatro estructuras con mayor puntuación de origen de ratón se emplearon para el modelo. Para el gen de VH, empleamos 1PLG, 1MNU, 1A5F y 1IGI que tienen una identidad de secuencia del 66-78% (79-85% de similitud) con 9O12. Para el gen de VL, empleamos 1PLG, 1MNU, 1IGI y 1AXT 45 que tienen una identidad de secuencia del 87-90% (94-95% de similitud). Las estructuras tridimensionales de todas estas secuencias se determinaron con una resolución superior a 2,8 Å. Se generaron veinte modelos para cada dominio empleando un programa informático Modeler 3.0, y el mejor de todos se seleccionó basándose en el valor de RMSD (0,13 Å para VH y 0,703 Å para VL) y un estudio detallado.

50 A continuación procedimos a la humanización de los dominios V de 9O12. Para ello se realizaron búsquedas con FASTA para alinear independientemente las secuencias de aminoácidos de VH y VL frente a un repertorio de secuencias de anticuerpos humanos registradas en la genoteca PDB. Entre los dominios V humanos que se emparejaban con 9O12, seleccionamos en primer lugar un VH y un VL procedentes de la misma molécula de anticuerpo para conservar los contactos entre dominios que tienen lugar en un anticuerpo natural. El anticuerpo humano 55 1VGE se seleccionó porque tenía la mejor puntuación de identidad con 9O12 cuando se extendieron las secuencias completas del dominio V, y se encontró que mostraban una identidad del 62% y 55% con VH y VL, respectivamente. Cuando se calculó solo sobre secuencias de regiones armazón, la identidad era ligeramente mejor,

mostrando una identidad del 69,5% y 65,4%, respectivamente. Además, la estructura cristalográfica de 1VGE se determinó con alta resolución (2 Å y valor R de 0,18). Por ello decidimos injertar las CDRs de 9O12 en el molde de 1VGE *in silico*. Un gen que codificaba esta estructura artificial se sintetizó químicamente y se insertó en pSW1 exactamente como se había hecho para m scFv9O12. Las células TOPP1 transformadas con este vector se indujeron para expresar la proteína recombinante.

Esto daba como resultado un primer fragmento scFv humanizado, denominado hscFv 9O12.2(1)

Competencia con IgG 9O12.2:

El scFv9O12.2 (100 µg/ml) se mezcló con concentraciones crecientes de IgG 9O12.2 antes de la adición a pocillos de microtitulación recubiertos con GVI-Fc. El scFv unido se detectó como se ha descrito anteriormente.

10 Efecto del anticuerpo sobre la unión de GPVI a colágeno:

Los pocillos de microtitulación se recubren con colágeno fibrilar de tipo I (colágeno Horn, Nycomed, Múnich 2 µg/pocillo), saturados con BSA y se lavan. Se añaden cantidades crecientes de GPVI-Fc preincubada con PBS, scFv 9O12.2 o Fab 9O12.2 a los pocillos. Después de una hora a temperatura ambiente y el lavado, la GPVI-Fc unida se detecta usando un Fc anti-humano acoplado a peroxidasa y OPD.

15 Resonancia de plasmones superficiales (SPR, BIAcore):

La unión de los scFv anti-GPVI a GPVI-Fc recombinante se analiza con resonancia de plasmones superficiales utilizando un sistema de BIAcore 2000 (Uppsala, Suecia). Los estudios de la unión se realizan con scFv 9.012, Fab proteolítico e IgG parental.

20 La GPVI-Fc recombinante se inmoviliza (~600 RU) sobre un chip sensorial CM5 de carboxi-metil dextrano, usando el método de acoplamiento con amina (procedimiento Wizard). El anticuerpo pasa después sobre la GPVI-Fc recombinante inmovilizada en tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,005% de polisorbato 20 (v/v)) con un caudal de 20 µl/min a 25°C. Las constantes cinéticas (k_a , k_d) y la afinidad se determinan utilizando la versión 3.1 del programa informático BIAevaluation, ajustando los datos al modelo de unión. HBS-EP es el tampón de ejecución. Glicina-HCl 10 mM, pH 2,5 inyectado durante 30 s a 20 µl/min es el tampón de regeneración. Todos los reactivos y los tampones usados son de Biacore.

Unión del scFv purificado a GPVI de plaquetas humanas

30 Plaquetas humanas lavadas (2×10^7 /mL) se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con 0 a 100 µg/ml de scFv 9O12 purificado y después se incuban de nuevo durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con 5 µL de IgG anti-c-myc acoplada a FITC (dilución 1:60). La fluorescencia celular se mide usando un citómetro de flujo (Epics XL, Coulter). El ruido de fondo se determina mediante el uso de un scFv irrelevante en lugar de scFv 9O12.2.

Agregación plaquetaria

35 Las plaquetas humanas lavadas (3×10^8 /mL) se preincuban durante 5 min a 37°C sin agitación, con PBS, scFv 9O12.2 o Fab 9O12.2. La agregación se inicia mediante la adición de colágeno de tipo I y los cambios en la transmisión de la luz se registran continuamente (Chronolog Aggregometer).

Agregación plaquetaria bajo condiciones de flujo

40 La adhesión de las plaquetas al colágeno en condiciones de flujo se midió esencialmente tal y como se ha descrito en otra parte (9). Cubreobjetos de vidrio se recubrieron con colágeno fibrilar de tipo I ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La sangre de voluntarios sanos se recogió en PPACK 40 µM y se marcó con DIOC-6 (1 µM). Partes alícuotas de sangre se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con tampón o un fragmento de anticuerpo purificado (Fab 9O12, m scFv9O12, scFv 9C2) hasta tener una concentración final de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Después, la mezcla se perfundió sobre cubreobjetos recubiertos con colágeno, insertados en una cámara de flujo a 1500 s^{-1} durante 5 minutos. La transmisión y las imágenes fluorescentes se registraron en tiempo real usando un microscopio de fluorescencia. Las imágenes fluorescentes se obtuvieron a partir de al menos diez campos microscópicos distintos que contenían colágeno, que se elegían arbitrariamente al final de la perfusión. El área de cobertura de las imágenes fluorescentes se analizó fuera de línea empleando el programa informático Histolab (Microvision, Evry, Francia).

Generación de trombina

50 La generación de trombina se midió de forma continua en plasma rico en plaquetas (PRP) empleando el método Thrombogram tal y como se ha descrito previamente (38). Brevemente, PRP citrado ($1,5 \times 10^8$ plaquetas mL^{-1}) se incubó con los fragmentos de anticuerpo durante 10 min a 37°C, antes de añadir el colágeno. Diez minutos más tarde, se inició la generación de trombina transfiriendo las muestras a los pocillos de una placa de microtitulación que contenía factor tisular (0,5 pM). Después de 5 min a 37°C, la reacción se inició añadiendo tampón que contenía CaCl_2 y el sustrato fluorescente de trombina Z-GGR-AMC (Stago, Asnières, Francia)). La acumulación de

fluorescencia del sustrato escindido se midió de forma continua en longitudes de onda de excitación y emisión de 390 y 460 nm, respectivamente. Las primeras curvas derivadas de la acumulación de fluorescencia se convirtieron en curvas de concentración de trombina, utilizando un calibrador de trombina (39). La altura del pico es un indicador de la tasa máxima de formación de trombina, y es sensible a la activación de las plaquetas.

5 1.2 Resultados

1.2.1 scFv 9O12.2 de ratón (mscFv 9O12.2)

Clonación de los ADNc de VH y VL del anticuerpo 9O12.2.2

9O12.2 es una IgG₁ de ratón (cadena kappa). El ARN total se extrajo de aproximadamente 5.10⁸ células de hibridoma recién subclonadas en un procedimiento de una sola etapa utilizando Trizol. Esta preparación de ARN se utilizó como molde para la síntesis de la primera cadena de ADNc. Los ADNc bicatenarios que codificaban los dominios VH y VL de IgG 9O12.2.2, fueron amplificados a continuación mediante PCR, utilizando conjuntos de cebadores (VHRev, VHFor) y (MKRevU, MKC5For), respectivamente. La secuencia de ADNc de VH era única y esto se confirmó mediante secuenciación del ADNc después de clonarlo en pGEMT. La secuencia del producto de la PCR correspondiente al dominio VL estaba desorganizada. Después de clonar en pGEMT y secuenciar varios clones, se identificaron dos secuencias de VL. El análisis de los datos utilizando el análisis FASTA mostró que una de las secuencias de VL obtenida a partir del clon MOPC-21 expresaba un ARNm no funcional, endógeno y aberrante de Vk (Gene bank número de entrada M35669). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del otro gen de VL y del gen de VH se muestran en la Figura 2 como parte del scFv 9O12.2. Estas secuencias se compararon con las secuencias de la región variable de inmunoglobulina, registradas en varias genotecas (UNIPROT UNIREF100 UNIREF90 UNIREF50 UNIPARC SWISSPROT IPI PRINTS SGT PDB IMGTHLAP, PATENT: epop jpop uspop). (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) (Genotecas de ADN: EMBL, HUMAN, MOUSE, SYNTHETIC, PATENT). Esto nos permitió identificar los tres bucles correspondientes a las regiones determinantes de la complementariedad de las regiones VH y VL y los residuos de aminoácidos que participaban en las estructuras convencionales.

25 Las CDRs se identificaron según las siguientes reglas, tal y como se deduce a partir de Kabat et al. (1991) y Chotia y Lesk (1987):

• CDR-L1:

Inicio – aproximadamente residuo 24

El residuo anterior es siempre una Cys

30 El residuo posterior es siempre un Trp. Típicamente TRP-TYR-GLN, pero también, TRP-LEU-GLN, TRP-PHE-GLN, TYR-TRP-LEU

Longitud de 10 a 17 residuos.

• CDR-L2:

Inicio - siempre 16 residuos después del final de L1

35 Residuos anteriores generalmente ILE-TYR, pero también, VAL-TYR, ILE-LYS, ILE-PHE

Longitud siempre 7 residuos.

• CDR-L3:

Inicio - siempre 33 residuos después del final de L2

El residuo anterior es siempre Cys

40 Los residuos posteriores son siempre PHE-GLY-XXX-GLY

Longitud 7 a 11 residuos.

• CDR-H1:

Inicio – aproximadamente el residuo 26 (siempre 4 después de una CYS) [Definición de Chothia/AbM]. La definición de Kabat se inicia 5 residuos después

45 Los residuos anteriores son siempre CYS-XXX-XXX-XXX

Los residuos posteriores son siempre un TRP. Normalmente TRP-VAL, pero también, TRP-ILE, TRP-ALA

Longitud de 10 a 12 residuos (definición de AbM), la definición de Chothia excluye los 4 últimos residuos.

• CDR-H2:

Inicio - siempre 15 residuos después del final de la definición de Kabat/AbM) de CDR-H1

Los residuos anteriores son típicamente LEU-GLU-TRP-ILE-GLY, pero con un número de variaciones

5 Los residuos posteriores son LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA

Longitud según la definición de Kabat de 16 a 19 residuos (la definición de AbM termina 7 residuos antes).

• CDR-H3:

Inicio - siempre 33 residuos después del final de CDR-H2 (siempre 2 después de una CYS)

Los residuos anteriores son siempre CYS-XXX-XXX (normalmente CYS-ALA-ARG)

10 Los residuos posteriores son siempre TRP-GLY-XXX-GLY

Longitud de 3 a 25 residuos.

15 La secuencia del ADNc de VH mostraba 92,96% de identidad con el ADNc que codificaba otro dominio VH de ratón (MMMD52C). Para la VL encontramos 98,51% de identidad con la secuencia de ADNc que codificaba el dominio VL del anticuerpo anti-acetil-Lys de ratón (BD174891). El análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas también mostró una alta homología con la secuencia de Ig de ratón. VH de 9O12.2 mostró 89,256% de identidad con la secuencia de aminoácidos deducida de una IgG anti-CD20 de ratón (BD688655). VL de 9O12.2 mostró 96,43% de identidad con la secuencia de aminoácidos deducida de una IgG anti-acetil Lys de ratón (BD581288).

Diseño del scFv 9O12.2

20 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del scFv 9O12.2 se muestran en la Figura 2. El scFv tiene una longitud de 266 aminoácidos y está compuesto por las secuencias de VH y VL unidas entre sí por un enlazador [G₄S]₃ y está seguido por un espaciador corto (8 residuos) y la secuencia del marcador c-myc (11 residuos).

Características estructurales teóricas del scFv

25 La masa molecular teórica del scFv es de 28393,5 según se determinó usando el programa informático ProtParam. Su pI es de 6,92 y el coeficiente de extinción 49640 M⁻¹ cm⁻¹ a 280 nm.

(Tabla 3).

Tabla 3. Características estructurales teóricas de scFv 9O12 tal y como se deducen del análisis bioinformático empleando el programa informático ProtParam

Número de aminoácidos: 266

30 Peso molecular: 28393,5

pI teórico: 6,92

Composición de aminoácidos:

	Ala	(A)	11	4,1%
	Arg	(R)	9	3,4%
35	Asn	(N)	9	3,4%
	Asp	(D)	11	4,1%
	Cys	(C)	4	1,5%
	Gln	(Q)	15	5,6%
	Glu	(E)	11	4,1%
40	Gly	(G)	37	13,9%
	His	(H)	2	0,8%
	Ile	(I)	7	2,6%
	Leu	(L)	24	9,0%
	Lys	(K)	13	4,9%
45	Met	(M)	4	1,5%
	Phe	(F)	9	3,4%
	Pro	(P)	8	3,0%
	Ser	(S)	36	13,5%

Thr	(T)	21	7,9%
Trp	(V)	6	2,3%
Tyr	(Y)	11	4,1%
Val	(V)	18	6,8%

5 Número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 22

Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 22

Composición atómica:

10	Carbono	C	1247
	Hidrógeno	H	1934
	Nitrógeno	N	340
	Oxígeno	O	403
	Azúfre	S	8

Fórmula: C1247H1934N340O403S8

Número total de átomos: 3932

15 Coeficientes de extinción:

Los coeficientes de extinción están en unidades de M⁻¹ cm⁻¹, a 280 nm.

Coeficiente de ext. 49640

Abs 0,1% (=1 g/l) 1,748, suponiendo que todos los residuos Cys aparecen como medias cistinas

Coeficiente de ext. 49390

20 Abs 0,1% (=1 g/l) 1,739, suponiendo que ningún residuo Cys aparece como medias cistinas

Semivida estimada:

El extremo N-terminal de la secuencia considerada es Q (Gln).

La semivida estimada es: 0,8 horas (reticulocitos de mamíferos, *in vitro*)

10 min (levadura, *in vivo*).

25 10 horas (*Escherichia coli*, *in vivo*)

Índice alifático: 69,21

Gran promedio de hidropaticidad (GRAVY): -0,333

Modelización molecular de scFv 9O12.2

Archivos Pdb de dominios variables de ratón utilizados como molde son:

30 para el dominio VH: 1PLG: H; 1MNU: H; 1A5F: H; 1IGI: H.

para el dominio VL: 1PLG: L; 1IGI: L; 1MNU: L; 1AXT: L.

Se utilizó el programa informático Modeller 3.0 para el modelado de los dominios variables. Se diseñaron veinte modelos para cada dominio y el mejor se seleccionó de acuerdo con el valor RMSD: VH (RMSD: 0,13 Å); VL (RMSD: 0,703 Å). El modelo se muestra en la Figura 3.

35 Análisis de los extractos periplásmicos

Para determinar si el scFv tenía la actividad anti-GPVI esperada, los extractos periplásmicos se sometieron a ensayo utilizando plaquetas humanas y una IgG anti-c-myc acoplada a FITC. La figura 4 muestra un desplazamiento hacia la derecha de la fluorescencia de las plaquetas en presencia del scFv 9O12.2 (40% de plaquetas positivas) pero no en presencia del scFv irrelevante (0,17% de plaquetas positivas). Por otra parte, cuando los extractos periplásmicos se incubaron con GPVI soluble recombinante inmovilizada, solo se detectó la unión del scFv 9O12.2. En conjunto, estos resultados indican que el scFv 9O12.2 conserva propiedades anti-GPVI.

40 Producción y purificación del scFv 9O12.2

Las proteínas contenidas en el extracto periplásmico, la fracción de flujo a través y la fracción eluida de la columna de GPVI-sefarosa se analizaron mediante SDS-PAGE y por inmunotransferencia (Figura 5A y 5B). La fracción eluida aparece como una banda principal de ~28 kDa, lo que concuerda con la masa teórica. Esta banda también se

45

detecta por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-c-myc. Estos resultados indican que la cromatografía de afinidad permite obtener una fracción de scFv considerablemente pura.

Cromatografía de exclusión por tamaño

5 Cuando se aplicó la preparación purificada de scFv a una columna Superdex 75 HR 10/30, se observó un pico principal de ~25 kD correspondiente a scFv monómero (Figura 6). Este pico estaba precedido por dos picos de menor importancia en 45 y 68 kDa correspondientes a scFv dímero y oligómero.

10 El scFv monómero era muy estable y las formas multímeras volvían a convertirse espontáneamente en monómeros cuando se almacenaban a 4°C, lo que es esencial para conservar la unión monovalente a GPVI y los efectos biológicos. De hecho, está bien establecido que moléculas anti-GPVI bivalentes (IgGs o F(ab)₂) pueden causar la activación de las plaquetas (40;93).

Unión del scFv 9O12.2 a GPVI-Fc purificada y competencia con la IgG 9O12.2

El scFv purificado se unía de forma dependiente de la dosis a GPVI-Fc purificada, inmovilizada sobre una placa de microtitulación (Figura 7). La especificidad de la unión se indicaba por el hecho de que un scFv no relevante no se unía a GPVI en las mismas condiciones.

15 Además la unión del scFv a GPVI purificada se inhibía de forma dependiente de la dosis por la IgG parental (Figura 7B).

Afinidad del scFv 9O12.2 hacia GPVI soluble

20 La afinidad de la IgG 9O12.2 y de su Fab preparado después de la digestión con papaína (pFab) hacia GPVI-Fc determinada por resonancia de plasmones superficiales, es elevada con una K_D de respectivamente 6,5 10⁻⁹ M y 4,5 10⁻⁹ M. La K_D del scFv es de 2,5 10⁻⁹ M (Figura 8).

En una segunda serie de experimentos, se determinaron los siguientes valores de parámetros cinéticos $k_{on} = 6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = 1,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y la constante de disociación $K_D = 2,6 \text{ nM}$ para scFv 9O12.2; y $K_D = 2,3 \text{ nM}$ para el fragmento Fab proteolítico de 9O12 y $K_D = 4,0 \text{ nM}$ para la IgG parental. Estos valores son muy similares a los obtenidos en los primeros experimentos y confirman el valor nanomolar de K_D .

25 Por lo tanto, el scFv 9O12 de ratón todavía tiene una afinidad funcional muy elevada, con un valor de K_D en el rango de 10⁻⁹ M y esto contribuye ciertamente a la estabilidad de los complejos scFv-GPVI de plaquetas, lo que es esencial para inhibir la agregación plaquetaria en condiciones de flujo.

El scFv 9O12.2 purificado inhibe la unión de GPVI a colágeno.

30 El scFv 9O12.2 inhibía de forma dependiente de la dosis la unión de GPVI-Fc purificada con colágeno fibrilar inmovilizado de tipo I (Figura 9). Su capacidad inhibitoria es cercana a la de pFab 9O12.2.

Más precisamente, mscFv 9O12 inhibía la unión de GPVI a colágeno con una CI_{50} de aproximadamente 1,17 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (42 μM), alcanzándose una inhibición del 80% con una concentración de 5 a 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de mscFv 9O12. Esta capacidad inhibitoria era comparable a la observada para Fab 9O12 preparado después de digestión con papaína de la IgG parental (2,1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 15 nM).

35 El scFv 9O12.2 purificado se une a las plaquetas humanas e inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno.

La unión de scFv purificado a plaquetas humanas se midió por citometría de flujo. Un desplazamiento hacia la derecha del pico indica que el scFv se une a las plaquetas humanas de una manera dependiente de la dosis (Figura 10). Un scFv purificado no relevante no se unió a las plaquetas.

40 El efecto del scFv 9O12.2 sobre la función de GPVI se sometió a ensayo midiendo la agregación plaquetaria inducida por colágeno. Para este fin, se purificaron formas monómeras del scFv por cromatografía en gel de exclusión por tamaño. El scFv 9O12.2 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) evitaba completamente la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Figura 11) al igual que el pFab 9O12.2 empleado con la misma concentración.

Agregación plaquetaria bajo condiciones de flujo

45 Además, se investigaron los efectos de mscFv 9O12 sobre la adhesión y la agregación plaquetaria al colágeno en condiciones de flujo arterial, y se compararon con los de Fab 9O12 y un scFv irrelevante (véase la Figura 12). Una vez más, la agregación plaquetaria inducida por colágeno se inhibió. En presencia del scFv o de Fab, solo se observaron plaquetas aisladas fijadas a las fibras de colágeno de acuerdo con resultados previos (9; 41) y, en contraste con las condiciones del testigo, no se observaron grandes agregados de plaquetas.

Generación de trombina

50 Puesto que Fab 9O12 es conocido por inhibir la generación de trombina en la superficie de las plaquetas

estimuladas con colágeno, el efecto del m_{scFv} 9O12 purificado se sometió a ensayo usando el método Thrombogram (Figura 13). m_{scFv} 9O12 y Fab 9O12 redujeron el pico de trombina a grados similares, y aumentaron la latencia anterior a la generación de trombina, lo que indica que m_{scFv} 9O12 es tan eficaz como Fab 9O12 en la inhibición de la actividad procoagulante de las plaquetas inducidas con colágeno.

5 1.2.2 Primer scFv 9O12.2 humanizado (hscFv 9O12.2(1))

Los inventores han humanizado a continuación el fragmento scFv 9O12.2 de ratón, tal y como se ha descrito en el apartado 1.1.2. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida de los dominios VL y VH humanizados y del primer fragmento scFv 9O12.2 humanizado (hscFv9O12.2(1)) se muestran en la Figura 14. Este fragmento hscFv 9O12.2(1) se caracterizó adicionalmente empleando la unión por afinidad a GPVI sefarosa: la fracción periplásmica de bacterias recombinantes se cargó en una columna de GPVI sefarosa. Las proteínas retenidas se analizaron por transferencia Western utilizando una IgG anti-c-myc seguida de anticuerpo anti-ratón acoplado a HRP y revelado ECL. Se detecta una sola banda con una masa molecular de 28,5 kDa (Figura 15), como se esperaba para el scFv humanizado.

La unión de hscFv 9O12.2(1) a GPVI-Fc se analizó y se comparó después con la de scFv 9O12.2 de ratón (m_{scFv} 9O12.2). scFv y humanizado purificado y m_{scFv} se inyectaron sobre GPVI-Fc inmovilizada en un chip sensorial CM5. Los resultados se muestran en la Figura 16 y muestran que hscFv 9O12.2(1) también se une a GPVI-Fc, por lo que parece tener una afinidad mayor que m_{scFv} .

Finalmente, se estudió la unión de hscFv 9O12.2(1) a plaquetas humanas. Las plaquetas humanas se incubaron con extractos periplásmicos bacterianos. hscFv 9O12.2(1) unido a las plaquetas se detectó utilizando anticuerpo anti-c-myc acoplado a FITC. La unión a las plaquetas se analizó en un citómetro de flujo XL Epics Coulter. Un scFv irrelevante se utilizó como testigo negativo. Los resultados se muestran en la Figura 17 y muestran un cambio a la derecha del histograma de hscFv, lo que indica que el scFv 9O12.2(1) humanizado se une a GPVI de las plaquetas.

1.3 Conclusión

Los resultados mostrados anteriormente muestran claramente que a pesar de las modificaciones estructurales esenciales, el scFv 9O12.2 de ratón generado por los inventores a partir del anticuerpo monoclonal 9O12.2, se une específicamente a GPVI humana con una afinidad elevada. Además, inhibe la unión de GPVI a colágeno y evita la agregación plaquetaria inducida con colágeno, inhibiendo de este modo la función de GPVI.

Este fragmento scFv muestra por lo tanto todas las ventajas de los fragmentos scFv a la vez que conserva la afinidad y la capacidad de inhibición de fragmentos Fab correspondientes.

Además, los inventores también han generado una primera versión humanizada del fragmento scFv 9O12.2, que también se une a GPVI humana con una alta afinidad, a pesar de nuevas modificaciones estructurales esenciales (hscFv 9O12.2(1)).

Este primer fragmento scFv 9O12.2 humanizado (hscFv 9O12.2) tiene, además, la ventaja de una inmunogenicidad potencial reducida al mínimo.

Esta solicitud describe por lo tanto por primera vez un ligando de GPVI poco inmunógeno, de peso molecular bajo, con una alta capacidad para inhibir la agregación plaquetaria, lo que da como resultado un producto muy prometedor para el tratamiento de la trombosis arterial.

Ejemplo 2 Síntesis y actividad de un segundo fragmento variable de cadena sencilla mejorado, humanizado hscFv 9O12.2(2) dirigido contra la glicoproteína VI humana

La producción del primer fragmento hscFv 9O12(1) humanizado recombinante fue complicada y, por ello, se requirieron algunos refinamientos en la construcción. Un segundo fragmento hscFv 9O12.(2) humanizado, mejorado se obtuvo por ello a partir de hscFv 9O12.(1).

2.1 Procedimiento Experimental

Construcción del segundo fragmento scFv humanizado (hscFv 9O12.2(2))

Hemos postulado que unas incompatibilidades estructurales imprevistas entre las CDRs de ratón originales y las regiones armazón aceptoras humanas, podrían haber dado lugar a un plegamiento incorrecto de los dominios V, y a la formación de cuerpos de inclusión insolubles que permanecieron secuestrados en el citoplasma bacteriano. Para soslayar estas dificultades, se realizaron algunas mejoras menores.

En primer lugar, observamos que el bucle de CDR L1 de 9O12 tiene 5 residuos más de longitud que el de 1VGE, y que las regiones armazón 1 y 2 de 9O12 y 1VGE tienen una puntuación de identidad baja (48% y 73%, respectivamente) (Figura 19). Esto sugería que FR1 y FR2 de la cadena ligera de 1VGE no son adecuadas para el plegamiento correcto de CDR L1.

Búsquedas extra con FASTA se realizaron utilizando FR1 y FR2 de VL de 9O12. Se encontró un emparejamiento excelente con 1X9Q humano para FR1 y FR2 (95,6 y 86,6 de puntuación de identidad, respectivamente, y 100% de similitud en ambos casos). Además, el bucle L1 (CDR1) del anticuerpo seleccionado 1X9Q, era similar en longitud al de 9O12.

- 5 Por lo tanto, decidimos conservar las FR1 y FR2 de VL de 9O12 de ratón originales en la nueva construcción de hscFv 9O12.(2) humanizado, ya que las secuencias de estas regiones armazón se adaptaban bien con otra región armazón de anticuerpo humano (1X9Q), cuya CDR L1 tiene exactamente el mismo tamaño que la de 9O12 (véase la Figura 19).

- 10 Otras mejoras se llevaron a cabo basándose en una revisión a fondo del modelo. En efecto, en la estructura artificial final de _hscFv 9O12 también se conservó un número muy limitado de residuos que podrían influir en la capacidad de los bucles de las CDRs para adoptar su conformación. Se conservaron dos áreas decisivas. La primera de ellas era el dipéptido LD en la posición 59-60 en VL. L59 (P en el molde humano), considerado como potencialmente significativo, ya que se encuentra en la proximidad de los residuos de L CDR2. Aunque L y P son ambos hidrófobos, P tiene una cadena lateral cíclica y se sabe que induce efectos específicos sobre la estructura del esqueleto de la proteína (MacArthur y Thornton, 1999). Además, nos dimos cuenta de que L se produce con mucha menos frecuencia que P en esta posición (2%), y esto puede ser indicativo de una función específica (Honegger y Pluckthun, 2001). Los otros residuos de ratón no mutados que no tienen similitudes con el molde humano (1VGE), se localizaron en VH FR3 (A_{H71}, K_{H73}, R_{H76}, numeración de Kabat). Por último, solo 5 residuos de ratón en VL y 10 en VH se mantuvieron en las regiones armazón humanas seleccionadas para la humanización.

- 20 La estructura artificial final se muestra en la Figura 19. Todas las regiones armazón de hscFv 9O12.(2) humanizado muestran 100% de similitud con las regiones armazón humanas, aparte de las regiones armazón 3 de VH y VL (90,62 y 93,75%, respectivamente) (véase la siguiente Tabla 1).

- 25 Tabla 1: Puntuaciones de la identidad y la similitud de las regiones armazón del dominio V de 9O12 humanizado con regiones armazón de anticuerpos humanos utilizados como molde. x es el número de residuos en la FR humanizada que son idénticos a residuos procedentes de FR humana. y es el número total de residuos en la FR.

Regiones armazón (FR)	Identidad		Similitudes
	x/y	%	%
V _H FR1	23/26	88,46	100
V _H FR2	14/14	100	100
V _H FR3	25/32	78,12	90,62
V _H FR4	11/11	100	100
V _L FR1	22/23	95,65	100
V _L FR2	13/15	86,60	100
V _L FR3	30/32	93,75	93,75
V _L FR4	10/10	100	100

- 30 En general, los 11 residuos N-terminales procedentes de VH FR3 de ratón se conservaban en la estructura artificial final, porque están situados claramente próximos a la parte plana de la bolsa en la que se espera que esté el antígeno, y así podrían interaccionar con él. Sin embargo, VH FR3 muestra 25/32 de identidad de residuos con 1VGE. Solo 3 residuos de esta región armazón (A_{H71}, K_{H73}, R_{H76}, numeración de Kabat) no tenían ninguna similitud con 1VGE. VL FR3 de 9O12 se sustituyó por su parte homóloga de 1VGE exceptuando dos residuos (L59P y D60S), debido esencialmente a que L no se encuentra con frecuencia en esta posición y D es un residuo ácido.

Otros Procedimientos Experimentales

- 35 Todos los demás procedimientos experimentales para la caracterización de los segundos fragmentos hscFv 9O12.(2) se realizaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1.

2.2 Resultados

La producción de hscFv9O12.2(2) era mejor que la de hscFv9O12.2(1).

- 40 Además, el fragmento hscFv9O12.2(2) purificado conservaba una elevada afinidad hacia su diana, tal y como se demostró por análisis de SPR frente a GPVI inmovilizada ($k_{on} = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = 1,86 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y constante de disociación $K_D = 3,2 \text{ nM}$).

- 45 También era capaz de unirse a plaquetas humanas recién preparadas en citometría de flujo, y el desplazamiento hacia la derecha del pico de la fluorescencia siempre era similar al de las células marcadas con el mscFv9O12 de ratón en condiciones experimentales similares (véase la Figura 20B). Se observó una inhibición casi total de la unión de hscFv9O12.2(2) cuando las plaquetas se mezclaban previamente con un exceso de Fab 9O12. Estos resultados demostraron que la molécula hscFv9O12.2(2) purificada por afinidad conservaba la actividad de unión, la afinidad y la especificidad del anticuerpo parental hacia GPVI, así como hacia GPVI de origen natural expuesta en la superficie

de plaquetas humanas.

2.3 Conclusión

5 Como para hscFv9O12.2(1), los parámetros principales que normalmente se ven afectados por la humanización estaban bien conservados en hscFv9O12.2(2). hscFv9O12.2(2) purificado por afinidad era completamente funcional, y tenía una alta afinidad hacia GPVI, un objetivo importante para las aplicaciones biológicas. Los análisis por FACS indicaron también que hscFv9O12.2(2) reconoce el mismo epítipo sobre las plaquetas humanas que Fab 9O12 de ratón, debido a que su unión estaba bloqueada específicamente en presencia de un exceso molar de Fab 9O12.

Bibliografía

1. WO 01/00810
- 10 2. WO 03/008454
3. Massberg S, Konrad I, Bultmann A, Schulz C, Munch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Muller I, Hu B, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *Faseb J.* 2004; 18:397-399
- 15 4. Gruner S, Prostedna M, Koch M, Miura Y, Schulte V, Jung S M, Moroi M, Nieswandt B. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood.* 2005; 105:1492-1499
5. EP 1224942
6. EP 1228768
7. EP1538165
8. WO 2005/111083
- 20 9. Lecut C, Feeney L A, Kingsbury G, Hopkins J, Lanza F, Gachet C, Villeval J L, Jandrot-Perrus M. Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:2653-2662
10. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave J P, Ohlmann P, Gachet C, Zirngibl H. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med.* 2001; 193:459-469.
- 25 11. Qian M D, Villeval J L, Xiong X, Jandrot-Perrus M, Nagashima K, Tonra J, McDonald K, Goodearl A, Gill D. Anti GPVI human antibodies neutralizing collagen-induced platelet aggregation isolated from a combinatorial phage display library. *Hum Antibodies.* 2002; 11:97-105.
12. Siljander P R, Munnix I C, Smethurst P A, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand W H, Farndale R W, Heemskerk J W. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood.* 2004; 103:1333-1341.
- 30 13. Matsumoto Y, Takizawa H, Gong X, Le S, Lockyer S, Okuyama K, Tanaka M, Yoshitake M, Tandon N N, Kambayashi J. Highly potent anti-human GPVI monoclonal antibodies derived from GPVI knockout mouse immunization. *Thromb Res.* 2006.
- 35 14. Juste M, Muzard J, P. Billiald. Cloning of the antibody kappa light chain V-gene from murine hybridomas by bypassing the aberrant MOPC21-derived transcript. *Anal Biochem.* 2006 1; 349(1):159-61
15. Kabat E. A., WU T. T., Perry H. M., Gottesman K. S., Foeller C (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5ª edición, Public Health Service, N.I.H., Washington D.C.
- 40 16. Chothia y Lesk. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) *J Mol Biol.* 1987 Aug. 20; 196(4):901-17.
17. Tsurushita N, Hinton P R & Kumar S (2005) Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax. *Methods* 36, 69-83
- 45 18. Fontayne A, Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Van Rompaey I, Meiring M, Lamprecht S, Roodt J, Desmet J & Deckmyn H (2006) Rational humanization of the powerful antithrombotic anti-GPIIb/alpha antibody: 6B4. *Thromb Haemost.* 96, 671-84.
19. Lazar G A, Desjarlais J R, Jacinto J, Karki S & Hammond P W (2007) A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization. *Mol Immunol.* 44, 1986-1998.

20. Jones P T, Dear P H, Foote J, Neuberger M S, Winter G. "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse". *Nature*. 1986; 321:522-525
21. Verhoeyen M, Milstein C, Winter G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science*. 1988; 239:1534-1536
- 5 22. Caldas C, Coelho V, Kalil J, Moro A M, Maranhao A Q & Brígido M M (2003) Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. *Mol Immunol*. 39, 941-52
23. Gonzales N R, Padlan E, De Pascalis R, Schuck P, Schlom J & Kashmiri S V (2004) SDR grafting of a murine antibody using multiple human germline templates to minimize its immunogenicity. *Mol Immunol*. 41, 863-872.
24. WO98/45322;
- 10 25. WO 87/02671;
26. U.S. Pat. No. 5.859.205;
27. U.S. Pat. No. 5.585.089;
28. U.S. Pat. No. 4.816.567;
29. EP0173494
- 15 30. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988; 332:323-327
31. Winter G & Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*. 1991 Ene. 24; 349(6307):293-9.
32. Ewert S, Honegger A, Pluckthun A. Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods*. 2004; 34(2):184-99.
- 20 33. EP1297172
34. EP1522590
35. Hamilton S R et al. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*. 2003 Ago. 29; 301(5637):1244-6.
- 25 36. Wildt S y Gerngross T U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol*. 2005 February; 3(2):119-28.
37. Ward E S, Gussow D, Griffiths A D, Jones P T, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 1989; 341: 544-546.
- 30 38. Lecut C, Feijge M A, Cosemans J M, Jandrot-Perrus M & Heemskerk J W (2005) Fibrillar type I collagens enhance platelet-dependent thrombin generation via glycoprotein VI with direct support of alpha2beta1 but not alpha1bbeta3 integrin. *Thromb Haemost*. 94, 107-114.
39. Hemker H C, Giesen P L, Ramjee M, Wagenvoort R & Béguin S (2000) The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*. 83, 589-591.
- 35 40. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K & Uchino H (1987) A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 69, 1712-1720.
41. Lecut C, Schoolmeester A, Kuijpers M J, Broers J L, van Zandvoort M A, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Jandrot-Perrus M & Heemskerk J W (2004) Principal role of glycoprotein VI in alpha2beta1 and alpha1bbeta3 activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24, 1727-33.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
 Jandrot-Perrus, Martine
 Billiald, Philippe
 Muzard, Julien

<120> Fragmento scFv anti-glicoproteína VI para el tratamiento de la trombosis

10 <130> D24429

<150> EP06291673.9
 <151> 26-10-2006

15 <160> 50

<170> PatentIn, versión 3.3

<210> 1
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos completa del fragmento scFv 9O12.2 de ratón

<400> 1
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Val Val Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu
 130 135 140
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr
 165 170 175
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser
 180 185 190
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 210 215 220
 Val Tyr Phe Cys Leu Gln Leu Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Arg Val Thr Val Ser Ser Glu

ES 2 437 515 T3

245 250 255
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 260 265

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 del dominio VH del fragmento scFv 9012.2 de ratón

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 1 5 10

10 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> CDR2 del dominio VH del fragmento scFv 9012.2 de ratón

<400> 3

Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 4
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 del dominio VH del fragmento scFv 9012.2 de ratón

<400> 4

Gly Thr Val Val Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 25 1 5 10

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR1 del dominio VL del fragmento scFv 9012.2 de ratón

<400> 5

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

35 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 del dominio VL del fragmento scFv 9012.2 de ratón

40 <400> 6

ES 2 437 515 T3

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3 del dominio VL del fragmento scFv 9012.2 de ratón
 <400> 7
 Leu Gln Leu Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5
 10 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Enlazador peptídico adecuado
 <400> 8
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 9
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico adecuado
 <400> 9
 Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser
 25 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador peptídico adecuado
 <400> 10
 Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico adecuado
 40 <400> 11
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 437 515 T3

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Enlazador peptídico adecuado
 <400> 12
 Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 13
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico adecuado
 15 <400> 13
 Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico adecuado
 <400> 14
 Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 25 <210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Enlazador peptídico adecuado
 <400> 15
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly
 <210> 16
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Marcador peptídico adecuado
 <400> 16
 His His His His His His
 40 1 5
 <210> 17

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Marcador peptídico adecuado
 <400> 17

 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10

 <210> 18
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Marcador peptídico adecuado
 <400> 18

 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 15 1 5

 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Marcador peptídico adecuado
 <400> 19

 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
 1 5

 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Marcador peptídico adecuado

 30 <400> 20

 Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
 1 5 10

 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Marcador peptídico adecuado
 <400> 21

 Glu Glu Thr Ala Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser
 1 5 10

 40 <210> 22
 <211> 14

ES 2 437 515 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Marcador peptídico adecuado
 5 <400> 22

 Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1 5 10

 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Marcador peptídico adecuado

 <400> 23

 Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10

 15 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Marcador peptídico adecuado

 <400> 24

 Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

 <210> 25
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Espaciador peptídico adecuado

 <400> 25

 Arg Ser Arg Val Thr Val Ser Ser
 30 1 5

 <210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VH del primer fragmento scFv 9012.2 humanizado

 <400> 26

ES 2 437 515 T3

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

5

<210> 27
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VL del primer fragmento scFv 9012.2 humanizado

<400> 27

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

10

Asp Leu Asn
 130
 <210> 28
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos completa del primer fragmento scFv 9012.2 humanizado
 <400> 28

ES 2 437 515 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gly Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Val Val Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser
 130 135 140
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr
 165 170 175
 Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser
 180 185 190
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 210 215 220
 Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Arg Val Thr Val Ser Ser Glu
 245 250 255
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 260 265

<210> 29
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de VH del primer fragmento scFv 9012.2 humanizado
 <400> 29

ES 2 437 515 T3

caggtgcagc tgcaggagtc aggggctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaagcagaca 120
 cctggacagc gcctggaatg gattggaggt atttatccag gaaatggatg cacttccttc 180
 aatcagaagt tcaaaggcaa ggccacattg acagctgaca aatcctccag gacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggaacg 300
 gtagtaggcg actggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccaactctcac agtctcctca 360
 ggcgaggcg gatccggtgg tggcggatct ggaggtggcg gaagcgatgt tttgatgacc 420
 caaactccac tctccctgcc tgtcagtctt ggagatcaag cctccatctc ttgcaggctt 480
 agtcagagcc ttgaaaacag taatggaaac acctatttga actggtacct ccagaaacca 540
 ggccagtctc cacagctcct gatctacagc gtttccaacc gattttctgg ggtcctagac 600
 aggttcagtg gtagtggatc agggacagat ttcacactga aatcagcag agtggaggct 660
 gaggatttgg gagtttattt ctgcctccaa cttacacatg tcccgtggac gttcggtgga 720
 ggaccaagc tggagatcaa acgctcgagg gtcaccgtct cctcagaaca aaaactcatc 780
 tcagaagagg atctgaatta ataa 804

<210> 30
 <211> 808
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de VL del primer fragmento scFv 9012.2 humanizado
 <400> 30

caggtgcagc tgcaggagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgtaaag cgagcggcta tagctttacc agctataata tgcattgggt gcgtcaggcg 120
 ccgggccagc gtctagaatg gatgggcggc atttatccgg gcaatggcga taccagcttt 180
 aatcagaaat ttaaaggcaa agcgaccctg accgccgata aaagcagccg taccgcgtat 240
 atgggcctga gcagcctgag cccggaagac accgccgtgt attattgtgc gcgtggcacc 300
 gtggtgggag attggtattt tgatgtgtgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
 ggcgaggcg gatccggtgg tggcggatct ggaggtggcg gaagcgatgt gctgatgacc 420
 cagagcccga gcagcctgag cgccagcgtg ggcgatcgtg tgaacattgc ctgccgtagc 480
 agccagagcc tggaaatgag caacggcaac acctatctga actggtatct ccagaaaccg 540
 ggcaaagcgc cgcggtgct gatattatcgt gtgagcaacc gtttttagcgg cgtgccgagc 600
 cgctttagcg gctccggaag cggcaccgat tttaccctga ccattagcag cctccagccg 660
 gaagattttg ccatctatta ttgcctccag ctgaccatg tgccgtggac ctttgggtggc 720
 ggaccaaaag tggaaatcaa acgctcgaga gttaccgtta gcagcgaaca gaaactgatt 780
 agcgaagaag atctgaatta ataataag 808

<210> 31
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos completa del primer fragmento scFv 9012.2 humanizado
 <400> 31

caggtgcagc tgcaggagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgtaaag cgagcggcta tagctttacc agctataata tgcattgggt gcgtcaggcg 120
 ccgggccagc gtctagaatg gatgggcggc atttatccgg gcaatggcga taccagcttt 180
 aatcagaaat ttaaaggcaa agcgaccctg accgccgata aaagcagccg taccgcgtat 240
 atgggcctga gcagcctgag cccggaagac accgccgtgt attattgtgc gcgtggcacc 300
 gtggtgggag attggtattt tgatgtgtgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360

<210> 32
 <211> 403
 <212> ADN

20

ES 2 437 515 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio VL del fragmento scFv 9012.2 humanizado

<400> 32

	gatgtgctga	tgacccagag	cccgagcagc	ctgagcgcca	gcgtgggoga	tcgtgtgaac	60
	attgcctgcc	gtagcagcca	gagcctggaa	atgagcaacg	gcaacaccta	tctgaactgg	120
	tatctccaga	aaccgggcaa	agcgccgcgg	ctgctgattt	atcgtgtgag	caaccgtttt	180
	agcggcgtgc	cgagccgctt	tagcggctcc	ggaagcggca	ccgattttac	cctgaccatt	240
	agcagcctcc	agccggaaga	ttttgccatc	tattattgcc	tccagctgac	ccatgtgccg	300
	tggacctttg	gtggcggcac	caaagtggaa	atcaaacgct	cgagagttac	cgtttagcagc	360
5	gaacagaaac	tgattagcga	agaagatctg	aattaataat	aag		403

<210> 33

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Oligodesoxirribonucleótido

<400> 33

	taatacgact	cactagggcg	aat	23
--	------------	------------	-----	----

<210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligodesoxirribonucleótido

20 <400> 34

	cggcagccgc	tgattgta	20
--	------------	----------	----

<210> 35

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Oligodesoxirribonucleótido

<400> 35

	cgagcttagc	cctataatt	cagatcctc	29
--	------------	-----------	-----------	----

30 <210> 36

<211> 68

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligodesoxirribonucleótido

<400> 36

	ggaggcggat	ccggtggtgg	cggatctgga	ggtggcggaa	gcgatgtttt	gatgacccaa	60
	actccact						68

<210> 37

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Oligodesoxirribonucleótido

ES 2 437 515 T3

	<400> 37	
	accaccggat ccgcctccgc ctgaggagac ggtgaccgt	39
	<210> 38	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligodesoxirribonucleótido	
	<400> 38	
10	accctcgag cgttgatct ccagcttgg	30
	<210> 39	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligodesoxirribonucleótido	
	<400> 39	
	ggcgactggt acttcgatg c	21
	<210> 40	
20	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligodesoxirribonucleótido	
	<400> 40	
25	aaatggtgac acttcctca atca	24
	<210> 41	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligodesoxirribonucleótido	
	<400> 41	
	gtttcaagg ctctgactag acct	24
	<210> 42	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligodesoxirribonucleótido	
	<400> 42	
40	ggattacagt tggcgagca tc	22
	<210> 43	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligodesoxirribonucleótido	
	<400> 43	
50	gayattgtgm tsacmcarwc t	21

ES 2 437 515 T3

<210> 44
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligodesoxirribonucleótido

<400> 44
 cgggatcctc tagacagtgg ataracmgat gg 32

10 <210> 45
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligodesoxirribonucleótido

15 <400> 45
 cgggatcctc tagaggttsma rctgcagsag tcwgg 35

<210> 46
 <211> 131
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VL del segundo fragmento scFv 9012.2 humanizado

<400> 46
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ser Arg Val Thr Val Ser Ser Asp Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 115 120 125
 Asp Leu Asn
 130

25 <210> 47
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Secuencia de aminoácidos completa del segundo fragmento scFv 9012.2 humanizado

<400> 47

ES 2 437 515 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gly Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Val Val Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu
 130 135 140
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr
 165 170 175
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser
 180 185 190
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 210 215 220
 Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Arg Val Thr Val Ser Ser Asp
 245 250 255
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 260 265

<210> 48
 <211> 360
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de VH del segundo fragmento scFv 9012.2 humanizado

<400> 48
 caggtgcagc tgcaggaaag cggcgccgaa gttaaaaaac cgggcgccag cgtgaaagtg 60
 agctgtaaag cgagcggcta tagctttacc agctataaca tgcattgggt tcgtcaggcg 120
 ccgggtcagc gtctagaatg gatgggcggc atttatccgg gcaacggcga taccagcttt 180
 aaccagaaat tcaaaggcaa agcgaccctg accgccgata aaagcagccg taccgcctat 240
 atgggcctga gcagcctgcg cccggaagac accgccgttt attattgcg gcgtggcacc 300
 gtggtgggcg attggtattt tgatgtgtgg ggccagggca ccttggttac cgtgagcagc 360

ES 2 437 515 T3

<210> 49
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de VL del segundo fragmento scFv 9012.2 humanizado.

<400> 49
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca ggtctagtca ggccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120
 tacctcaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acagggtttc caaccgattt 180
 tctggggtcc tagacagggt tagcggctcc ggaagcggca ccgatttcac gctgaccatt 240
 agcagcctgc aaccggaaga ttttgcgatt tattattgtc tgcaactgac ccatgtgccg 300
 tggacctttg gcggcggcac caaagtggaa attaaacgct cgagggtcac cgtctctca 360
 gatcaaaaac tcatctcaga agaggatctg aattaataa 399

10 <210> 50
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos completa del segundo fragmento scFv 9012.2 humanizado.

15 <400> 50

ES 2 437 515 T3

caggtgcagc tgcaggaaag cggcgccgaa gttaaaaaac cgggcgccag cgtgaaagtg	60
agctgtaaag cgagcggcta tagctttacc agctataaca tgcattgggt tcgtcaggcg	120
ccgggtcagc gtctagaatg gatgggcggc atttatccgg gcaacggcga taccagcttt	180
aaccagaaat tcaaaggcaa agcgaccctg accgccgata aaagcagccg taccgcctat	240
atgggcctga gcagcctgcg cccggaagac accgccgttt attattgcgc gcgtggcacc	300
gtggtgggcg attggtatth tgatgtgtgg ggccagggca ccttggttac cgtgagcagc	360
ggcggtggtg gatccggtgg tggcggatct ggaggtggcg gaagcgatgt tttgatgacc	420
caaactccac tctccctgcc tgtcagtctt ggagatcaag cctccatctc ttgcaggtct	480
agtcagagcc ttgaaaacag taatggaaac acctatthga actggtacct ccagaaacca	540
ggccagtctc cacagctcct gatctacagg gttccaacc gattttctgg ggtcctagac	600
aggthtagcg gctccggaag cggcaccgat ttcacgctga ccattagcag cctgcaaccg	660
gaagatthtg cgatthatta thgtctgcaa ctgaccatg tgccgtggac cthtggcggc	720
ggcacciaag tggaaattaa acgctcgagg gtcaccgtct cctcagatca aaaactcatc	780
tcagaagagg atctgaatta ataa	804

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento variable de cadena sencilla humanizado dirigido contra la glicoproteína VI humana, que comprende:
- 5 - un dominio VH que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 constituidas por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4,
- un enlazador peptídico, y
- un dominio VL que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 constituidas por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7
- 10 en el que las regiones armazón de los dominios VH y VL se han sustituido por los dominios VH y VL que tienen regiones armazón de un anticuerpo humano, en donde dicho fragmento variable de cadena sencilla humanizado tiene una afinidad superior hacia GPVI-Fc en comparación con el Fab de ratón correspondiente que es de $4,5 \cdot 10^{-9}$ M como se determina por resonancia de plasmones superficiales.
2. Un fragmento variable de cadena sencilla según la reivindicación 1, que comprende además un marcador peptídico y, opcionalmente, un espaciador peptídico corto.
- 15 3. Un fragmento variable de cadena sencilla según la reivindicación 2, que comprende o consiste en una secuencia de 266 aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, en la que los aminoácidos 26 a 35, 50 a 66, 99 a 109, 159 a 174, 190 a 196 y 229 a 237 de dicha secuencia de 266 aminoácidos están constituidos por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente.
- 20 4. Un fragmento variable de cadena sencilla según la reivindicación 3, que comprende o consiste en SEQ ID NO: 1.
5. Un fragmento variable de cadena sencilla humanizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 47.
- 25 6. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento variable de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende o consiste en SEQ ID NO: 29.
8. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende o consiste en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 49.
- 30 9. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
10. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión según la reivindicación 9.
11. Un método para preparar un fragmento variable de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende:
- 35 a) cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 10, y
- b) purificar dicho fragmento variable de cadena sencilla.
12. Un fragmento variable de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso como medicamento.

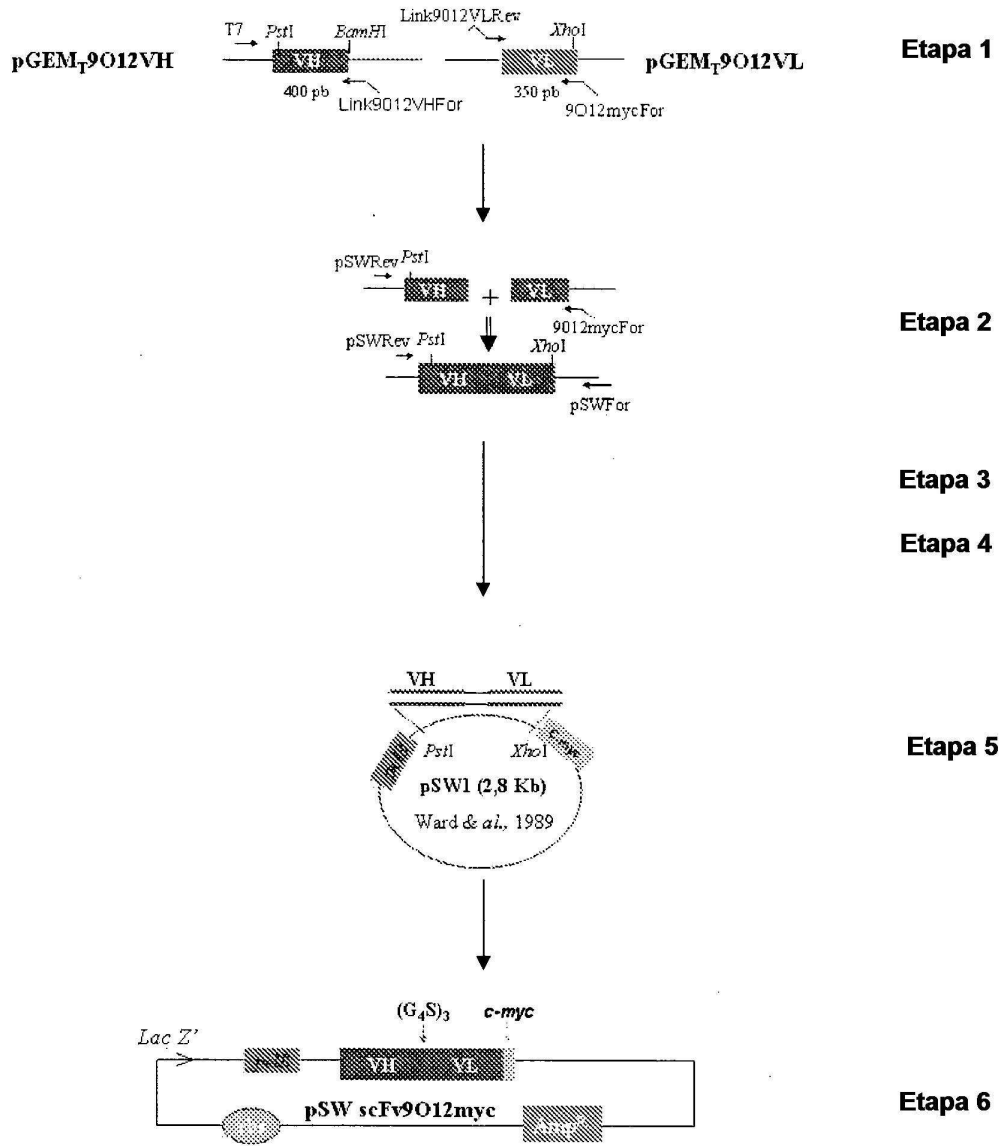


Figura 1

```

1           21           41           61           81
|           |           |           |           |
CAGGTT CAGCTTCCAGGAGT CAGGGGCTGAGCTGCTGAAAGCTGAGGCTTCTGAGGAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGATTTC
Q V Q L Q E S G A E L V K P G A S V X M S C K A S G Y T F T
^
PstI (U)

101           121           141           161
CDR H1 |           |           |           |           CDR H2
AGTTACAAATATGCACTGGGTAAGCAGACACCTGGACAGGGCCCTGGAAATGGATGGAGGTATTATTCAGGAAATGGTGCACCTTCCTTC
S Y N M H W V X Q T P G Q G L E W I G G I Y P G N G D T S F

181           201           221           241           261
|           |           |           |           |
AATCAGAGGTTCCAGGCAAGGCCACATTGACAGCTGACAAATCTTCCAGGACAGCTTACATGCAAGCTCAGAGCTGACATCTGAGGAC
N Q K F K G K A T L T A D K S S R T A Y M Q L S S L T S E D

281           301           321           341
|           |           |           |           |
TCTGGGCTTCTTTCCTGTCAGAGGCACTGAGTACAGGCTGGTACTTCGATGTCCTGGGCGCAGGCGCACTCTCACAGTCTTCTTA
S A V Y Y C A R G T V V G D W Y F D V W G A G T T L T V S S
^
CDR H3

361           381           401           421           441
|           |           |           |           |
GGCGGAGGGCGGATCGGGTGGGGGATTTGGAGGTTGGCGGAGGATGTTTGGATGACCCAAACTCCACCTTCTGCTGTCTGCTCAGTCTT
G G G G S G G G G S G G G S D W L M T Q T P L S L P V S L

461           481           501           521
|           |           |           |           |
GGAGATCAAGCTTCATCTCTTGGAGGCTTACTGAGGCTTGGAAAACAGTAAATGGAAAACCTATTGGAGCTGGTACCTCCAGAAACCA
G D Q A S I S C R S S Q S L E N S N G N T Y L N W Y L Q K P
^
CDR L1

541           561           581           601           621
|           |           |           |           |
GGCAGTCTCCAGAGCTCTGATCTACAGGCTTCCAGCCGATTTTCTGGGCTCCTAGCAGGTTCCCTGCTAGCTGGATCAGGACAGAT
G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V L D R F S G S G S G T D
^
CDR L2

641           661           681           701
|           |           |           |           |
TTCACCTGAAATCAGCAAGGTCAGGCTGAGGATTTGGAGTTTATTCTGCCTCCACTTACACATGCTCCGTTGAGCTTGGTGGG
F T L K I S R V E A E D L G V Y F C L Q L T H V P W T F G G
^
CDR L3

721           741           761           781           801
|           |           |           |           |
GGCACCAAGCTGGAGATCAAAACGCTCGAGGCTCCCTGCTCTCAGAACCAAAACTCATCTTCAAGAGAGGATCTGAAATTAATA
G T K L E I K R S R V T V S S E Q K L I S E E D L N - -
^
XhoI (U)

```

Figura 2

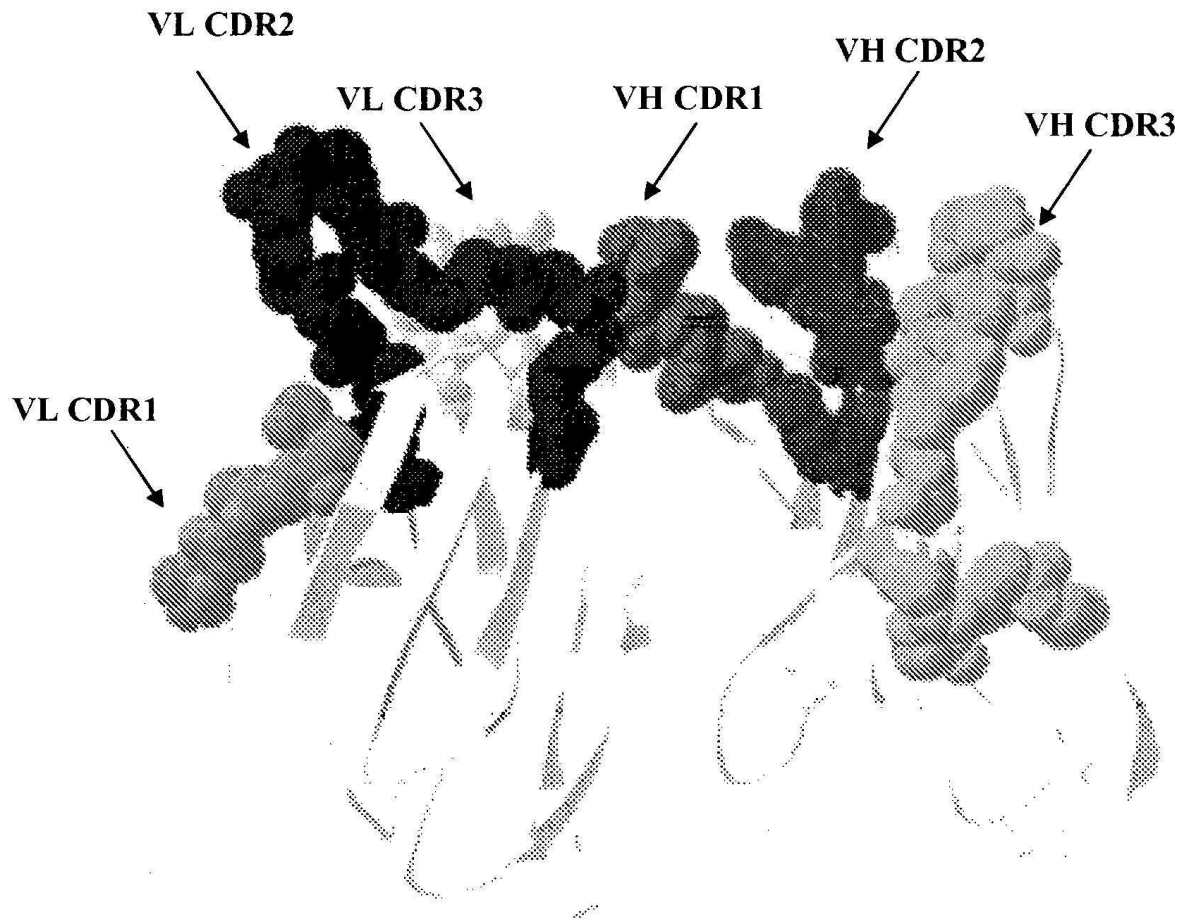


Figura 3

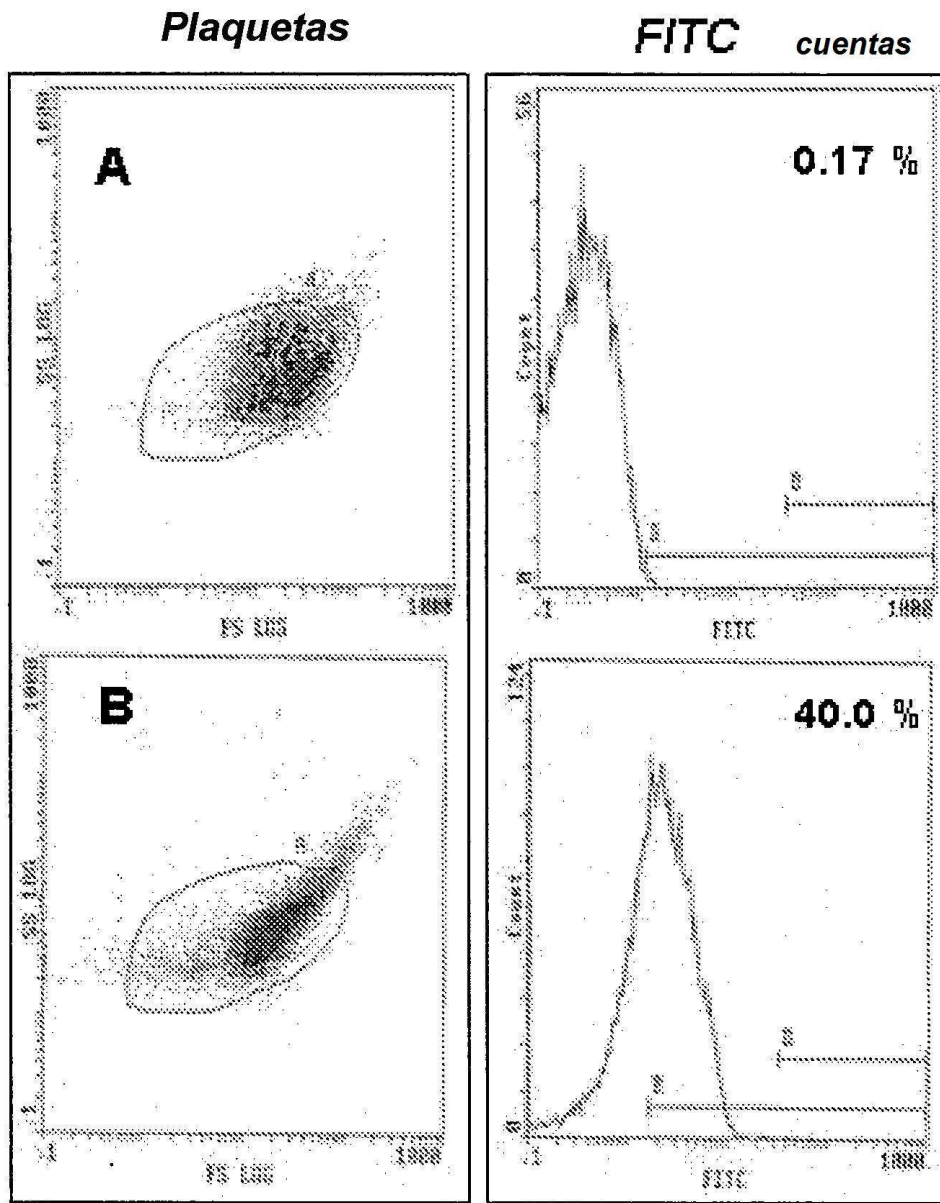


Figura 4

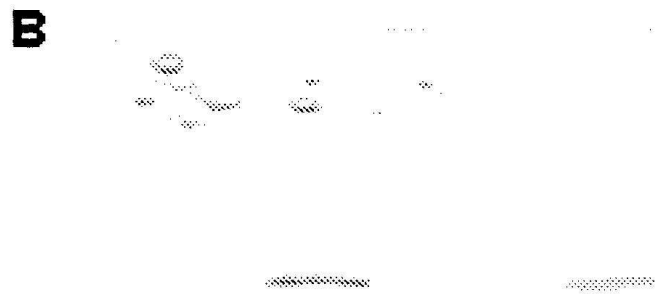
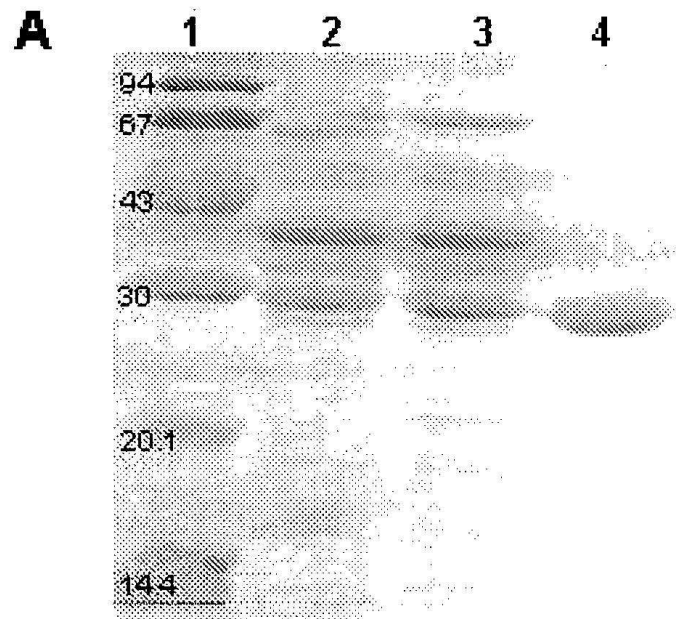


Figura 5

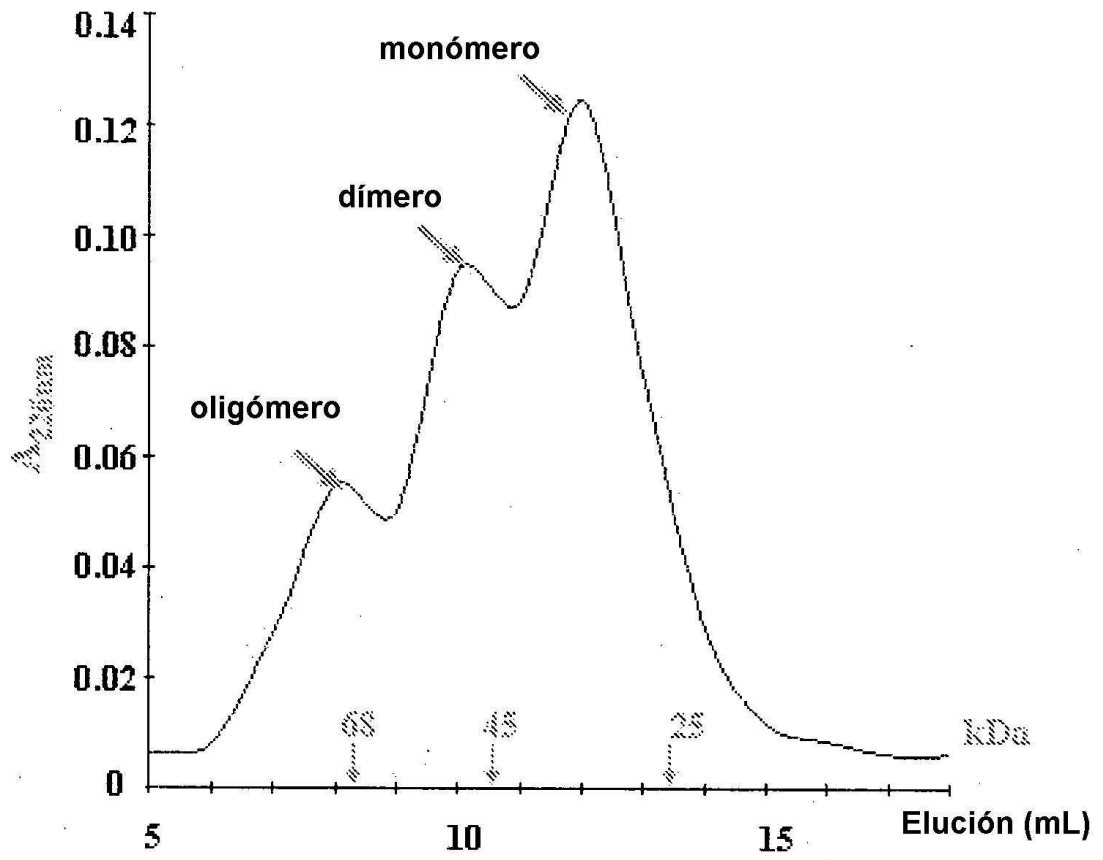


Figura 6

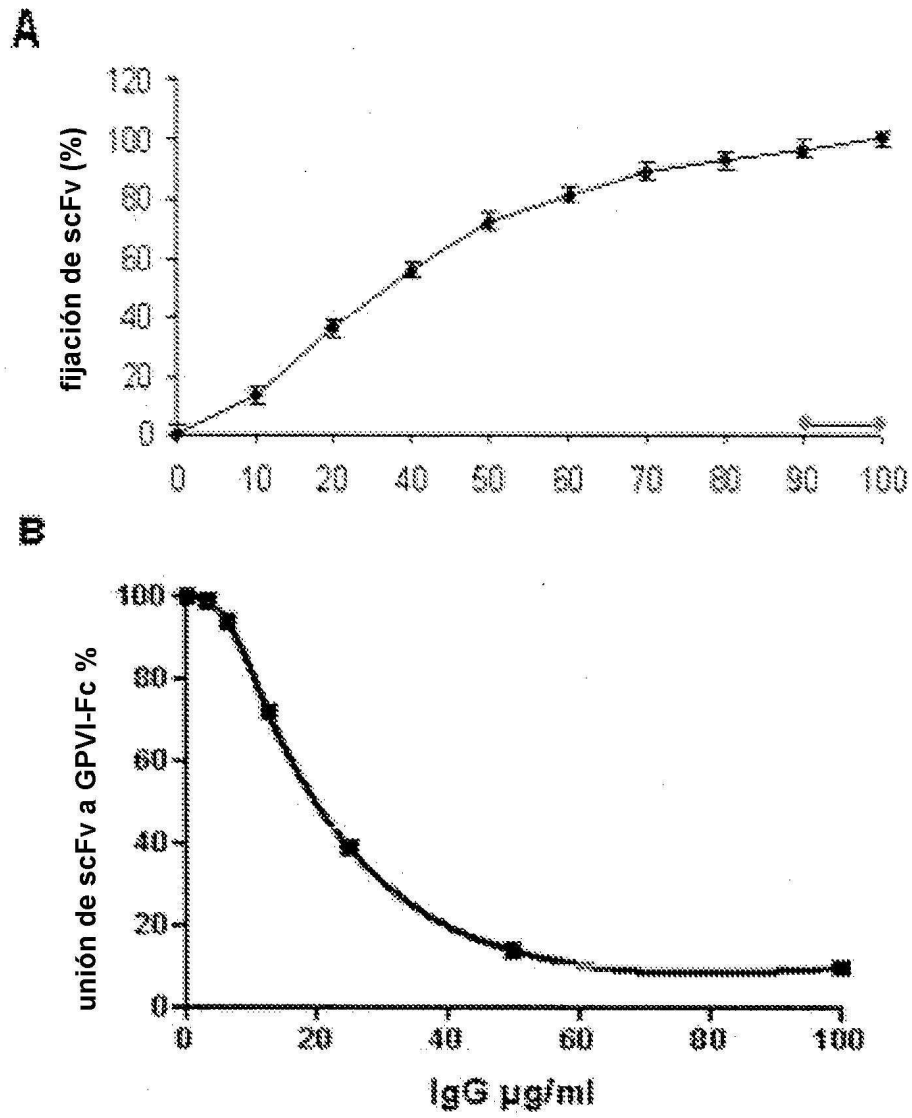


Figura 7

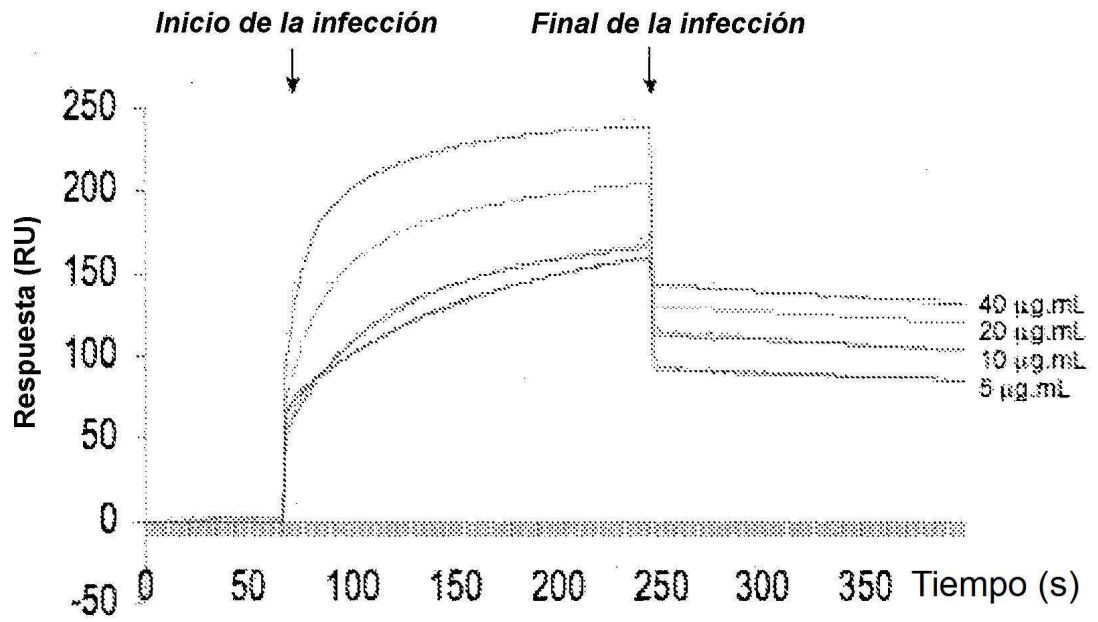
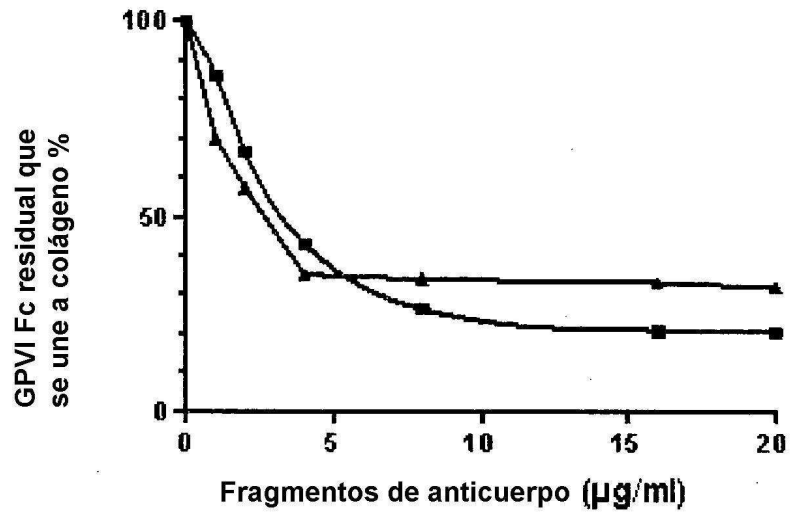


Figura 8

A



B

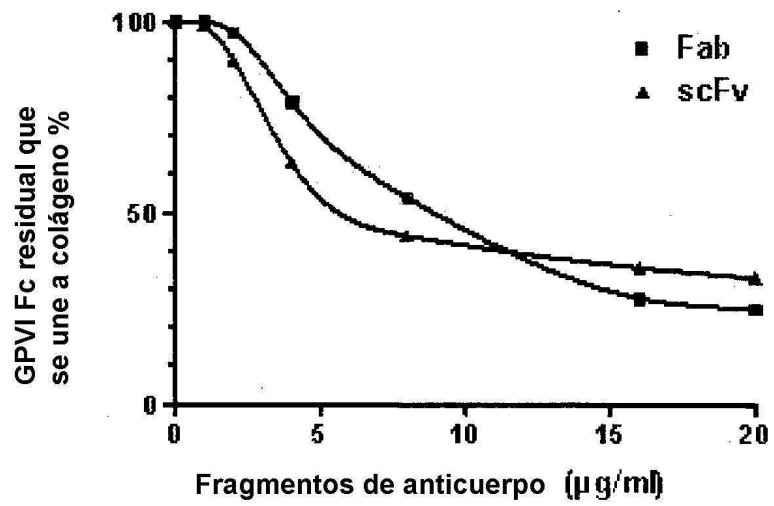


Figura 9

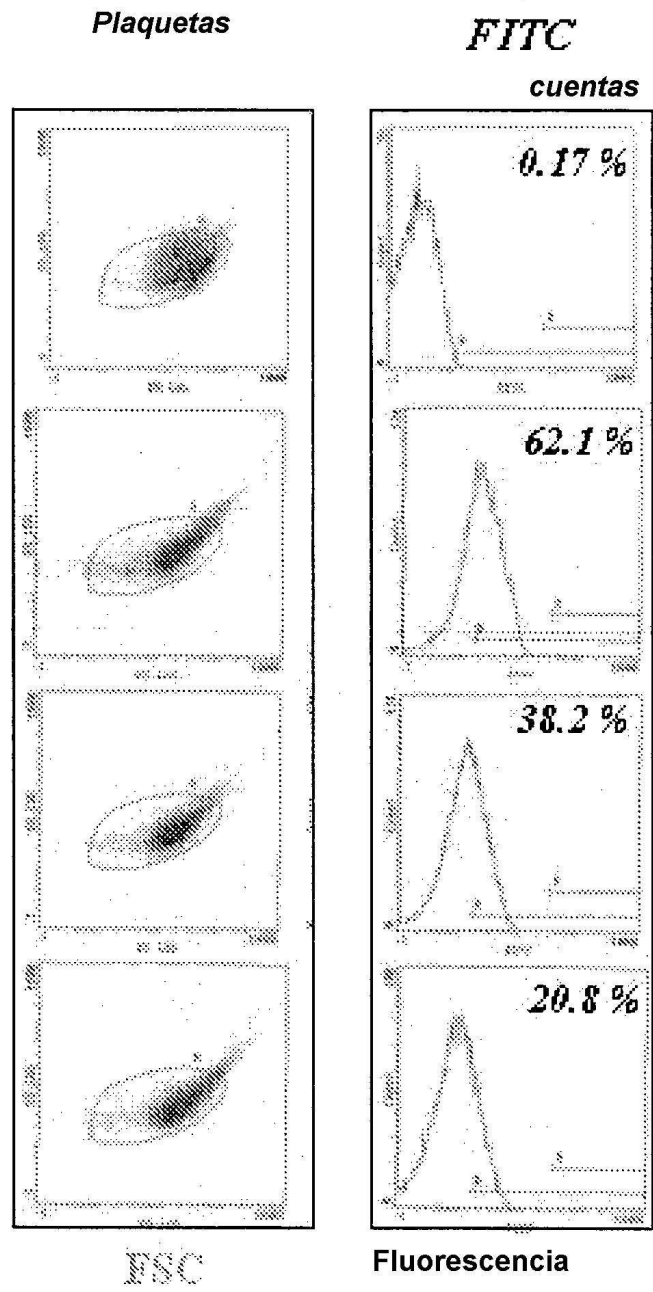


Figura 10

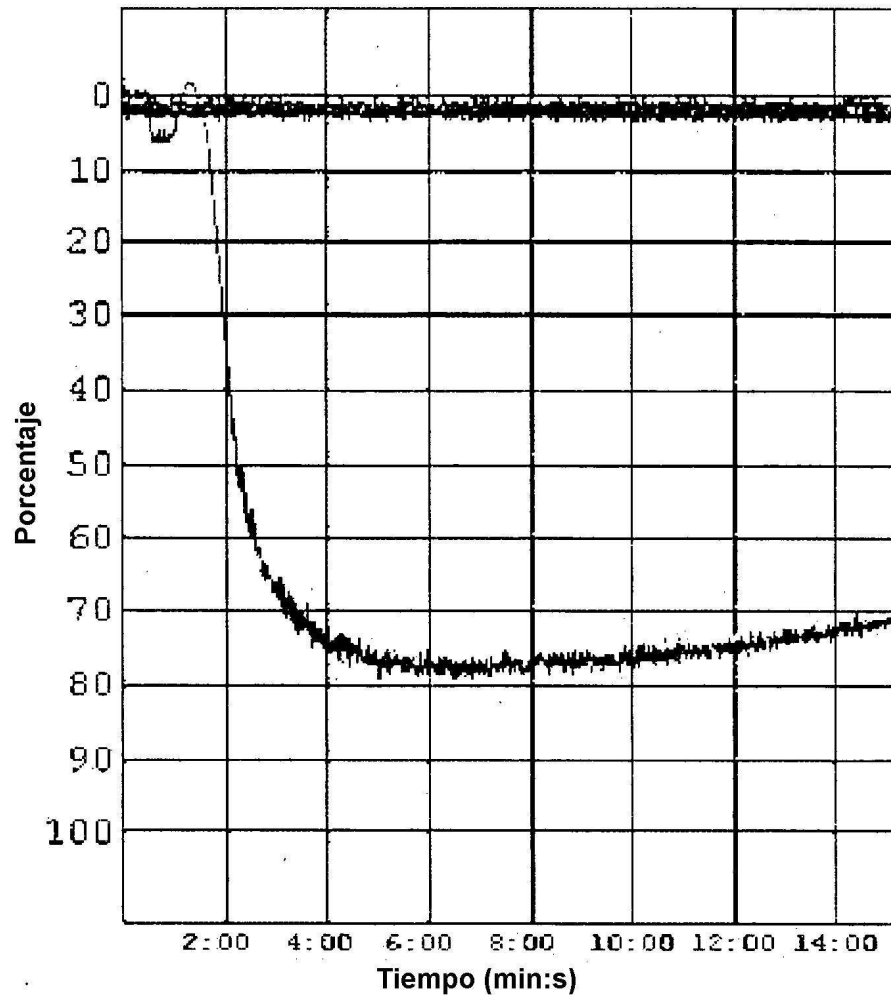


Figura 11

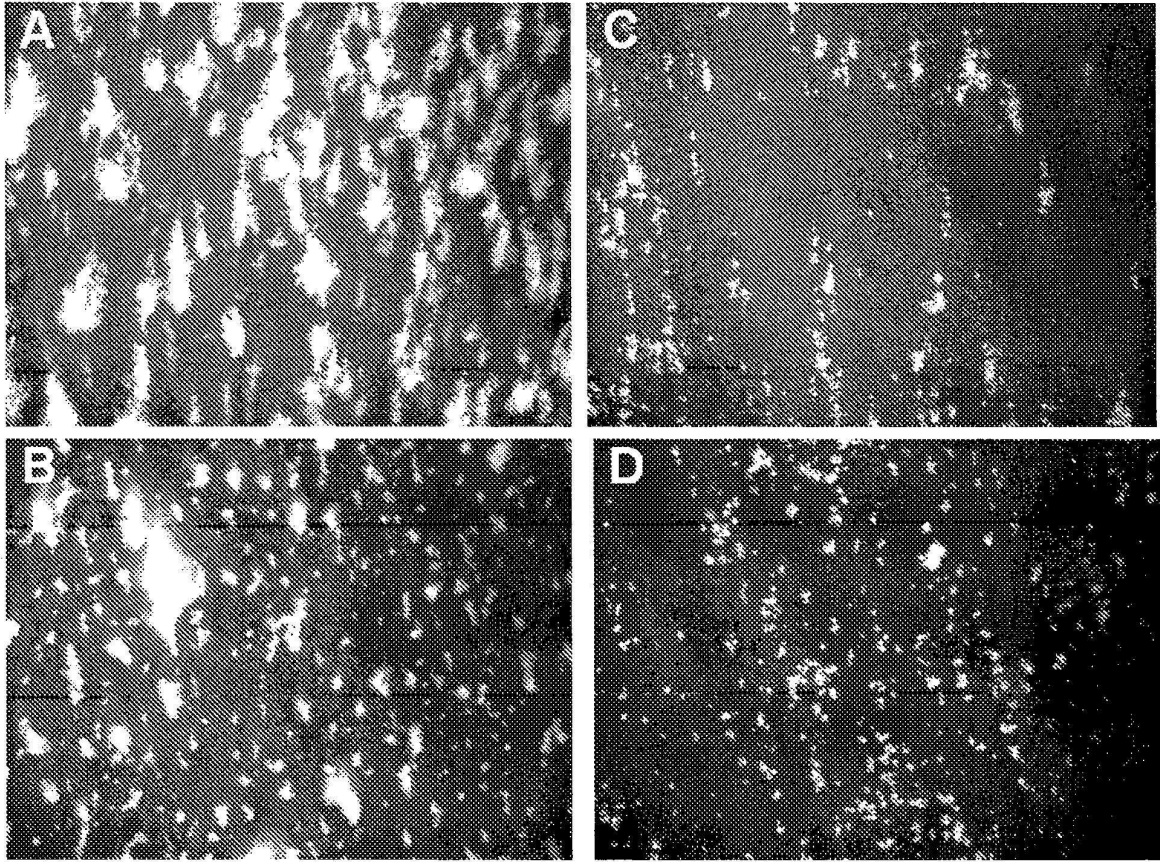


Figura 12

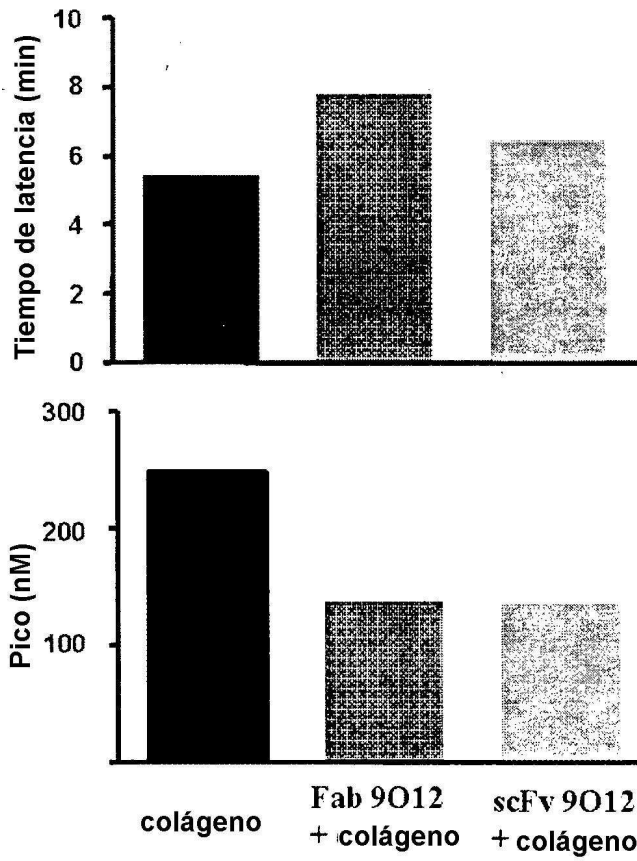
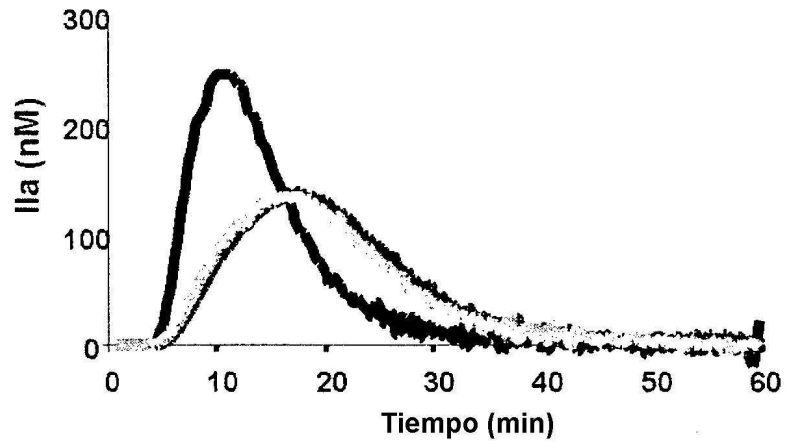


Figura 13

A 9012.2 VH humanizado (1)

>CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGGAGCGGTGAAAGTGAGCTGTAAAGCGAGCGG
 CTATAGCTTTACCAGCTATAATATGCATTGGGTGCGTCAGGCGCCGGCCAGCGTCTAGAATGGATGGGCGGCATTTA
 TCCGGGCAATGGCGATACCAGCTTTAATCAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCTGACCGCCGATAAAAAGCAGCCGTAC
 CGCGTATATGGGCGTGCAGCAGCTGCGCCCGGAAGACACCGCCGTGTATTATTGTGCGCGTGGCACCGTGGTGGGCGA
 TTGGTATTTTGTGTGTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:31)

Q V Q L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G
 Y S F T S Y N M H W V R Q A P G Q R L E W M G G I Y
 P G N G D T S F N Q K F K G K A T L T A D K S S R T
 A Y M G L S S L R P E D T A V Y Y C A R G T V V G D
 W Y F D V W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO :26)

Figura 14A

B 9012.2 VL humanizado

>GATGTGCTGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGTGTGAACATTGCCTGCCGTAGCAG
 CCAGAGCCTGGAAATGAGCAACGGCAACACCTATCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGCGGTGCT
 GATTTATCGTGTGAGCAACCGTTTTAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCTCCGGAAGCGGCACCGATTTTACCC
 GACCATTAGCAGCCTCCAGCCGGAAGATTTTGCCATCTATTATTGCCTCCAGCTGACCCATGTGCCGTGGACCTTTGG
 TGGCGGCACCAAAGTGGAAATCAAACGCTCGAGAGTTACCGTTAGCAGCGAACAGAACTGATTAGCGAAGAAGATCT
 GAATTAATAATAAG (SEQ ID NO :32)

D V L M T Q S P S S L S A S V G D R V N I A C R S S
 Q S L E N S N G N T Y L N W Y L Q K P G K A P R L L
 I Y R V S N R F S G V P S R F S G S G S G T D F T L
 T I S S L Q P E D F A I Y Y C L Q L T H V P W T F G G
 G T K V E I K R S R V T V S S E Q K L I S E E D L N
 - - - (SEQ ID NO:27)

Figura 14B

C Fragmento scFv 9012.2 humanizado

```
>CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGTAAAGCGAGCGG
CTATAGCTTTACCAGCTATAATATGCATTGGGTGCGTCAGGGCGCCGGGCCAGCGTCTAGAATGGATGGGCGGCATTTA
TCCGGGCAATGGCGATAACCAGCTTTAATCAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCTGACCGCCGATAAAAGCAGCCGTAC
CGCGTATATGGGCTTGAGCAGCC TCGGCCGGAAGACACCGCGGTGATTATTGTGCGCGTGGCACCGTGGTGGGCGA
TTGGTATTTTGTATGTGTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCGGAGGCGGATCCGGTGGTGGCGGATC
TGGAGGTGGCGGAAGCGATGTGCTGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGGCATCGTGTGAACAT
TGCCTGCCGTAGCAGCCAGAGCCTGGAAATGAGCAACGGCAACACCTATCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGCAA
AGCGCCGCGGCTGCTGATTTATCGTGTGAGCAACCGTTTTAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCTCCGGAAGCGG
CACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTCCAGCCGGAAGATTTGCCATCTATTATTGCCTCCAGCTGACCCATGT
GCCGTGGACCTTTGGTGGCGGCACCAAAGTGAAATCAAACGCTCGAGAGTTACCGTTAGCAGCGAACAGAAACTGAT
TAGCGAAGAAGATCTGAATTAATAATAAG (SEQ ID NO :30)
```

```
Q V Q L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G
Y S F T S Y N M H W V R Q A P G Q R L E W M G G I Y
P G N G D T S F N Q K F K G K A T L T A D K S S R T
A Y M G L S S L R P E D T A V Y Y C A R G T V V G D
W Y F D V W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S
G G G G S D V L M T Q S P S S L S A S V G D R V N I
A C R S S Q S L E N S N G N T Y L N W Y L Q K P G K
A P R L L I Y R V S N R F S G V P S R F S G S G S G
T D F T L T I S S L Q P E D F A I Y Y C L Q L T H V
P W T F G G G T K V E I K R S R V T V S S E Q K L I S
E E D L N - - - (SEQ ID NO:28)
```

Figura 14C

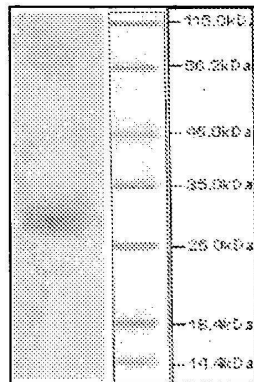


Figura 15

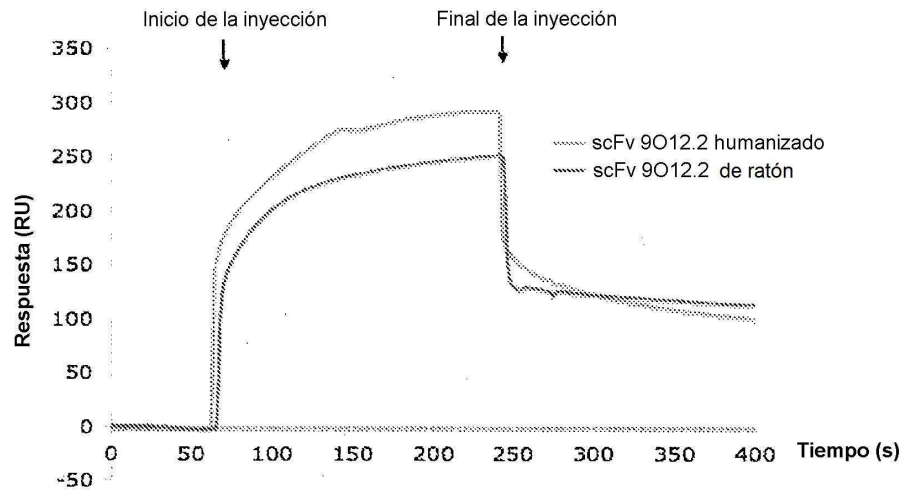


Figura 16

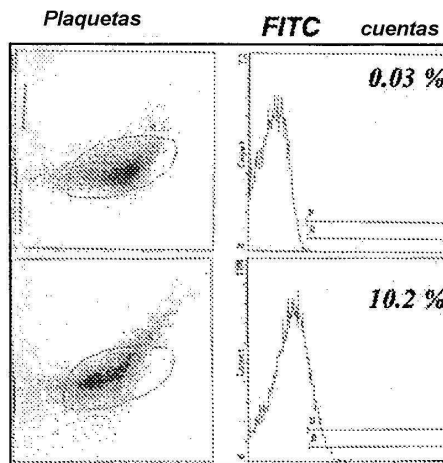


Figura 17

ES 2 437 515 T3

A 9012.2 VH (2) humanizado

CAGGTGCAG**CTGCAG**AAAAGCGCGCCGAAAGTTAAAAAACCGGCGCCAGCGTGAAGTGAAGCTGTAAGCGGACCGGCTATAGCTTTA
CCAGCTATAA**ACATGCAT**TGGGTTGCTCAGGCGCGCGGTCAGC**CTCTAGAAT**GGATGGGCGCATTATCCGGGCAACCGGATACCAAG
CTTTAACCCAGAAATTCAAAGGCAAAAGCGACCCCTGACCGCCGATAAAAGCAGCCCTACCGCCTATATGGGCTGAGCAGCCCTGCGCCCG
GAAGACACCCGCSTTTATTATTGCGCGCGCTGGCACCSTGGTGGGCGATTGGTATTTTATGTGTGGGCGCAGGCAACCCCTGGTTACCG
TGAGCAGC (SEQ ID NO :48)

Q V Q L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S **Q Y C F T**
S Y N M H W V R Q A P G Q R L E W M G G **I Y P G N C D T S E**
N D K F K E K A T L T A D K S S R T A Y M G L S S L R P E D
T A V Y Y C A R **E T V V S P W Y P E W** W G Q G T L V T V S S
(SEQ ID NO :26)

B 9012.2 VL (2) humanizado

GATSTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGACAGGTCTAGTCAGAGCCTTG
AAAACACTAATGGAAACACCTATTGAACTGGTACCTCCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGGGTTTCCAACCG
ATTTTCTGGGCTCCTAGACAGGTTTAGCGGG**TCCGGA**AGCGGCCACCGATTTACGCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCGGAAGATTTT
GCGATTATTATTGTCTGCAACTGACCCATGTGCCSTGGACCTTTGGCGCGCGCACCAAAGTGGAAATTAAC**CGTCGAG**GGTCAACCG
TCTCCTCAGATCAAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTAATAA (SEQ ID NO :49)

D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C **S S G S L E**
S N G D T L L W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y **V S N R P** G
V L D R F S G S G S G T D E T L T I S S L Q P E D F A I Y Y C
E C L Y R V P W T F G S G T K V E I K R S R V T V S S D Q K L
I S E E D L N (SEQ ID NO :46)

Figura 18A, 18B

C hscFv9O12.2 (2) humanizado

CAGGTGCAGCTGCAGGAAAAGCGGCGCGGAAAGTTAAAAAACCGCGCGCCAGCGTGAAGATGAGCTGTAAAGCGAGCGGCTATAGCTTTA
 CCAGCTATAAATGCATTGGGTTCTCAGGCGCGGCTCAGGCTCTAGAATGGATGGGCGCATTATTCGGGCAACGGCGATACCAG
 CTTTAAACCAAAATTCAAAAGCAAAAGCAACCTGACCGCGGATATAAAGCAGCGCTACCGGCTATATGGGCGCTGAGCAGCGCTGCGCGCG
GAAGACACCGCCSTTTATTATTGCGCGCGTGGCACCGTGGTGGGCGGATGGTATTTTTSATGTGTGGGCGCAGGCGCACCGCTGTTACCG
 TGAGCAAGCGCGCTGGTGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGAGGCTGGCGGAAAGCGATGTTTTSATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCG
 TGTCACTCTTGGAGATCAAGCGCTCCATCTCTTGCAGGCTCTAGTCAGAGCGCTTGAAAACAGTAATGAAAACACCTATTGAACTGGTAC
 CTCCAGAAAACCAAGCGCGCTCCACAGCTCTGATCTACAGGCTTTCCAAACCGATTTCTGGGCGCTAGACAGGTTTAGCGCGCTCCG
GAAGCGGCACCGATTTCAGCGCTGACCATTAGCAGCGCTGCAACCGGAAAGATTTTGGGATTTATTATTGTCTGCAACTGACCCATGTGCC
 GTGGACCTTTGGCGCGGCGCACCAAAAGTGGAAATTAAGCGCTGCAGGCGTCAACCGTCTCCTCAGATCAAAAACCTCATCTCAGAAAGAGAT
 CTGAATTAATAA (SEQ ID NO :50)

Q V Q L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S **Y D F I**
S Y N M H W V R Q A P G Q R L E W M G G **I Y I S N G D I G E**
N Q K F K S K A T L T A D K S S R T A Y M G L S S L R P E D
 T A V Y Y C A R **G T V V G F W Y F D V** W G Q G T L V T V S S
 S G S G S G G G G S G G G S D V L M T Q T P L S L P V S L
 G D Q A S I S C **R S S S S L E N S N S N T Y L N** W Y L Q K P
 G Q S P Q L L I Y **E V E N K F F S** G V L D R F S G S G S G T D
 F T L T I S S L Q P E D F A I Y Y C **L Q L I R V F W** T F G G
 G T K V E I K R S R V T V S S D Q K L I S E E D L N - -
 (SEQ ID NO :47)

Figura 18C

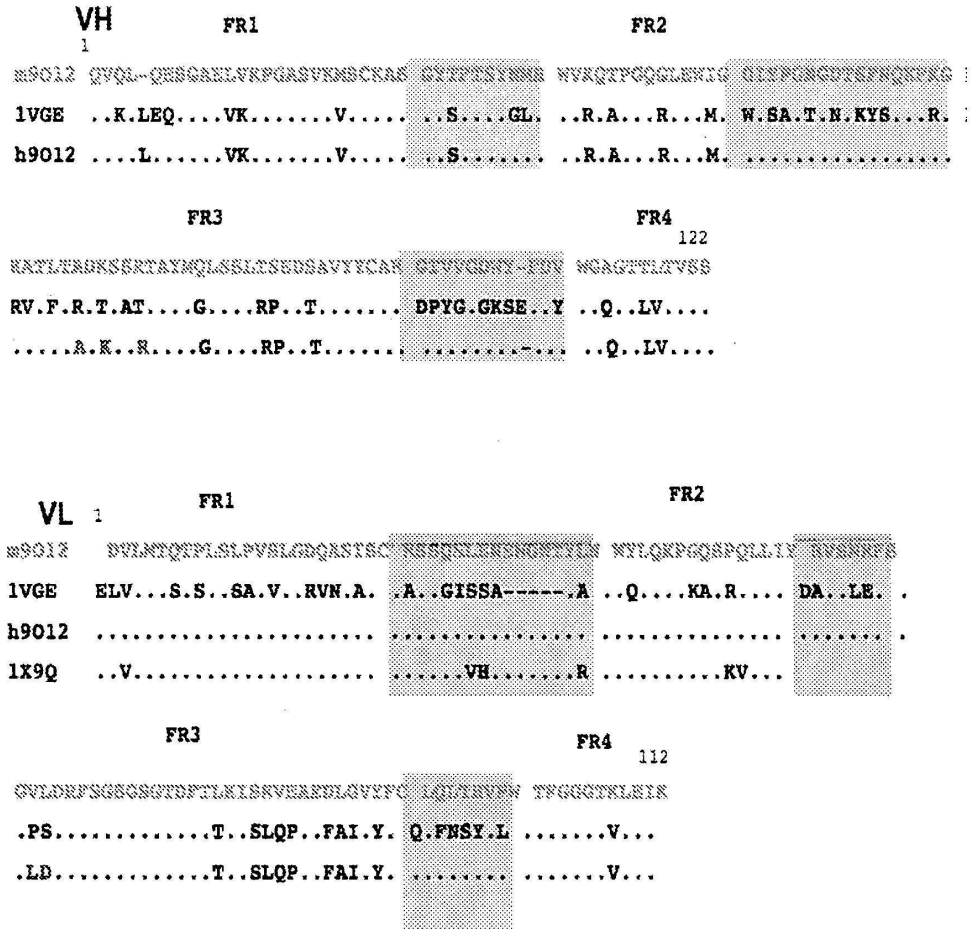
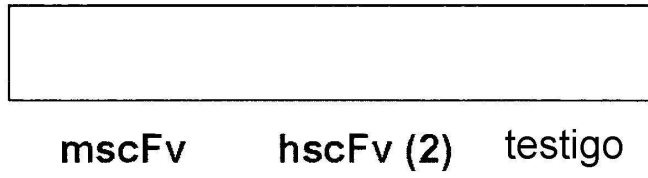


Figura 19

A



B

**scFv 9C2
(testigo)**

hscFv 9O12.2 (2)

**Fab 9O12
+
hscFv 9O12.2 (2)**

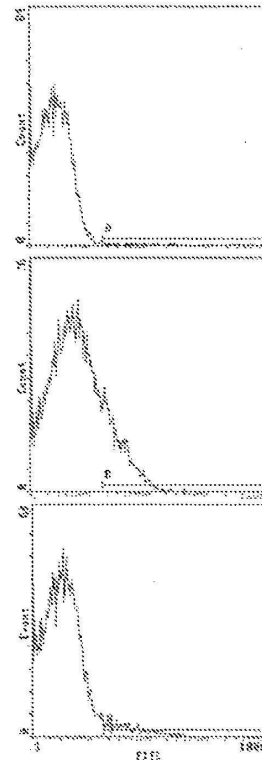


Figura 20