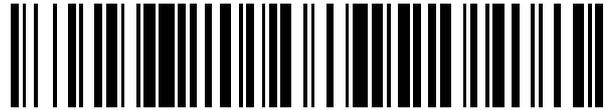


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 330**

51 Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/49 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61M 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2004 E 04700953 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1587838**

54 Título: **Polipéptidos terapéuticos, homólogos de los mismos, fragmentos de los mismos y su uso en modular la agregación mediada por plaquetas**

30 Prioridad:

10.01.2003 EP 03447005
23.06.2003 WO PCT/EP03/06581
08.07.2003 WO PCT/EP03/07313
07.11.2003 WO PCT/BE03/00193
07.11.2003 WO PCT/BE03/00189
07.11.2003 WO PCT/BE03/00190
07.11.2003 WO PCT/BE03/00192
07.11.2003 WO PCT/BE03/00194
01.12.2003 WO PCT/BE03/00206
02.12.2003 WO PCT/BE03/00191

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SILENCE, KAREN

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 542 330 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

Polipéptidos terapéuticos, homólogos de los mismos, fragmentos de los mismos y su uso en modular la agregación mediada por plaquetas

5

Antecedentes a la invención

Tras el daño a un vaso sanguíneo, quedan expuestas estructuras subendoteliales que median en la adhesión de plaquetas mediante la interacción con factor de von Willebrand (vWF). El vWF forma un puente entre el colágeno dentro de la pared del vaso dañado y el receptor de plaquetas, la glicoproteína Ib (gplb), una interacción especialmente importante en condiciones de alto cizallamiento, que conducen a la formación de un tapón hemostático y que así previene la excesiva hemorragia (Bennett S, Thromb Haemost (2001) Mar;85(3):395-400). Durante la hemostasia normal, estos procesos conducen a la cicatrización de la pared del vaso sanguíneo dañado. En afecciones patológicas, sin embargo, la excesiva función de las plaquetas puede conducir a la formación de trombos. La subunidad de vWF está compuesta por varios dominios homólogos que cubren cada uno diferentes funciones. El vWF interacciona mediante su dominio A3 con fibras de colágeno fibrilar y mediante su dominio A1 con el receptor de plaquetas gplb. Bajo condiciones normales, las plaquetas y vWF no interaccionan. Sin embargo, cuando vWF se une a colágeno a alta tasa de cizallamiento, se cree que experimenta un cambio conformacional que permite su unión con el receptor de plaquetas gplb. Esta adhesión reversible permite que las plaquetas pasen por encima del área dañada, que luego va seguido de una adhesión firme mediante los receptores de colágeno sobre las plaquetas (gpla/IIa, gpVI, gpIV, p65, TIIICBP), produciendo la activación de las plaquetas. Esto conduce a la activación del receptor de gpIIb/IIIa, unión a fibrinógeno, y finalmente a la agregación de plaquetas.

Se han aislado inhibidores de la agregación de plaquetas de organismos hematófagos tales como la sanguijuela. La saratina, derivada de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, se describe en el documento WO 02/15919 A2 y en Cruz CP et al. ref. La saratina, un inhibidor de la adhesión de plaquetas dependiente del factor de von Willebrand, disminuye la agregación de plaquetas y la hiperplasia de la íntima en un modelo de endarterectomía de carótida de rata. Journal of Vascular Surgery, 2001, 34: 724-729 y en Smith TP et al., Saratin, an inhibitor of collagen-platelet interaction, decreases venous anastomotic intimal hyperplasia in a canine dialysis access model, Vasc Endovascular Surg. 2003 Jul-Aug;37(4):259-69.

Se han desarrollado terapéuticos basados en anticuerpos, algunos de los cuales se usan actualmente en terapia.

Abciximab (Fab 7E3 quimérico; ReoPro; documentos US 6.071.514, EP 0 882 453), el fragmento Fab del anticuerpo quimérico humano de ratón 7E3 que inhibe la unión del ligando al receptor de plaquetas gpIIb/IIIa, fue aprobado para uso humano como terapia auxiliar para prevenir complicaciones isquémicas de intervenciones coronarias percutáneas en diciembre de 1994. La principal cuestión de seguridad con inhibidores de gp IIb/IIIa es el riesgo de hemorragia, ya que el potente efecto antiplaquetario de estos fármacos puede afectar adversamente la hemostasia.

Se desarrolló un anticuerpo monoclonal murino contra el dominio A1 de vWF (documentos US 2002/0028204 A1; US 6.280.731 y en WO 00/10601) y contra su conformación activa (documento US 6.251.393). La eficacia *in vivo* se describe en Kageyama S, et al.: "Effect of a humanized monoclonal antibody to von Willebrand factor in a canine model of coronary arterial thrombosis", Eur J Pharmacol. 2002 May 17;443(1-3):143-9, y en "Anti-human vWF monoclonal antibody, AJvW-2 Fab, inhibits repetitive coronary artery thrombosis without bleeding time prolongation in dogs". Thromb Res., 2001 Mar 1;101(5):395-404, y en "Anti-human von willebrand factor monoclonal antibody AJvW-2 prevents thrombus deposition and neointima formation after balloon injury in guinea pigs". Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Oct;20(10):2303-8). AJvW-2 inhibió la agregación de plaquetas humanas inducida por la alta fuerza de cizallamiento y no tuvo efecto sobre la agregación de plaquetas por la baja fuerza de cizallamiento.

Los efectos en babuinos de un anticuerpo murino 82D6A3 producido contra el dominio A3 de vWF humano se desvelan en el documento WO 02/051351, y Dongmei Wu et al., "Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons". Hemostasis, thrombosis and vascular biology, 2002, 99: 3623-3628.

El anticuerpo 6B4 es un anticuerpo monoclonal (mAb) producido contra gplb humana purificada. El mAb 6B4 inhibe la aglutinación de plaquetas humanas dependiente de vWF inducida tanto por ristocetina como por botrocetina. Además, el mAb 6B4 bloquea la adhesión inducida por cizallamiento de plaquetas humanas a colágeno I. Cuando se inyecta en babuinos, IgG intacta y sus fragmentos F(ab')₂ provocaron trombocitopenia casi inmediata, debido a la bivalencia de F(ab')₂ que media en la reticulación de plaquetas, o interacciones de Fc:receptor de Fc que median en la activación de la agregación de plaquetas (documento WO 0110911; Cauwenberghs N. et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 2000, 20: 1347 y véase, por ejemplo, Cadroy Y et al, Blood, 1994, 83: 3218-3224, Becker BH et al, Blood, 1989, 74: 690-694, Ravanat C. et al, Thromb. Haemost. 1999, 82: 528a abstract). Se inhibió la deposición de plaquetas sobre pericardio bovino rico en colágeno cuando los fragmentos Fab se inyectaron en los babuinos antes de generarse un trombo. Sin embargo, cuando los fragmentos Fab se inyectaron después de que se dejara formar un trombo, no se observó inhibición de la posterior trombosis. Los rendimientos de expresión de dichas moléculas de Fab son muy bajos y el método de producción es muy laborioso.

65

Objetivos de la presente invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar polipéptidos que comprendan uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos hacia vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, dominio A3 de vWF, gpIb y/o colágeno, homólogos de dichos polipéptidos y/o porciones funcionales de dichos polipéptidos, para el tratamiento para condiciones que requieren una modulación de la agregación mediada por plaquetas y que vence los problemas del estado de la técnica. Es otro objetivo proporcionar métodos de producción de dichos polipéptidos, métodos de recubrimiento de dispositivos con tales polipéptidos usados en procedimientos médicos (por ejemplo, PCTA, implantación de endoprótesis vascular), métodos y kits para cribar agentes que modulan la agregación mediada por plaquetas y kits para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la agregación mediada por plaquetas.

Sumario de la invención

Se han preparado anticuerpos de dominio único que reconocen específicamente moléculas diana que participan en la primera etapa y etapas posteriores de la agregación de plaquetas. Esto hace que los agentes antitrombóticos sean más eficaces y más seguros.

Una realización de la presente invención es una construcción de polipéptido según la reivindicación 1.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que el anticuerpo de dominio único dirigido contra el dominio A1 de vWF activado reconoce específicamente la conformación de vWF activado en el sitio de formación del trombo, pero no se une a formas inactivadas circulantes de vWF.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, que comprende además al menos un anticuerpo de dominio único dirigido contra una o más proteínas del suero.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que dicha al menos una proteína del suero es cualquiera de seroalbúmina, inmunoglobulinas del suero, proteína de unión a tiroxina, transferrina, o fibrinógeno o un fragmento de las mismas.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que al menos un anticuerpo de dominio único dirigido contra uno o más proteínas del suero se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 16 a 19 y 49 a 61.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 13 a 15 y 42 a 45.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que al menos un anticuerpo de dominio único es una secuencia humanizada.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 38 a 41 y 42 a 45

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 8 a 12, 20 a 22, 32 a 34, y 42 a 47.

Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que al menos un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo para VHH de *Camelidae*.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 7, 23 a 31, 35 a 37 y 62 a 65.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que dicho anticuerpo de dominio único es una secuencia homóloga, una porción funcional, o una porción funcional de una secuencia homóloga del anticuerpo de dominio único de longitud completa.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que dicha construcción de polipéptido es una secuencia homóloga de dicha construcción de polipéptido, una porción funcional de la misma, de una secuencia homóloga de una porción funcional de la misma.

Otra realización de la presente invención es un ácido nucleico que codifica una construcción de polipéptido como se

ha descrito anteriormente.

5 Otra realización de la presente invención es una composición que comprende una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente y al menos un agente trombolítico, para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.

10 Otra realización de la presente invención es una composición como se ha descrito anteriormente, en la que dicho agente trombolítico es cualquiera de estafilocinasa, activador tisular del plasminógeno, estreptocinasa, estreptocinasa monocatenaria, urocinasa y complejo acilado de plasminógeno-estreptocinasa.

15 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, o un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente, o una composición como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma.

20 Otra realización de la presente invención es un uso de una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, o un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente, o una composición como se ha descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma.

25 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido, ácido nucleico o composición como se ha descrito anteriormente o un uso de una construcción de polipéptido, ácido nucleico o composición como se ha descrito anteriormente en la que dichos trastornos son cualquiera que surja de ataque isquémico cerebral transitorio, angina inestable o estable, angina de pecho, infarto cerebral, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis, injerto de derivación coronaria, o valvuloplastia de la arteria coronaria e intervenciones coronarias tales como angioplastia, implantación de endoprótesis vascular, endarterectomía carotídea o aterectomía.

30 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido, ácido nucleico o composición como se ha descrito anteriormente o un uso de una construcción de polipéptido, ácido nucleico o composición como se ha descrito anteriormente, en la que dichos trastornos son cualquiera de formación de un trombo no oclusivo, formación de un trombo oclusivo, formación de trombo arterial, oclusión coronaria aguda, reestenosis, reestenosis después de PCTA o implantación de endoprótesis vascular, formación de trombo en arterias estenosadas, hiperplasia después de angioplastia, aterectomía o implantación de endoprótesis arterial, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de las arterias enfermas.

35 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido, ácido nucleico o composición como se ha descrito anteriormente o un uso de una construcción de polipéptido, ácido nucleico o composición como se ha descrito anteriormente, en la que dicho trastorno es formación de placas o de trombos en entornos de alto cizallamiento.

40 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido, ácido nucleico o composición como se ha descrito anteriormente o un uso de una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente, en la que dicha construcción de polipéptido se administra intravenosamente, subcutáneamente, por vía oral, sublingualmente, tópicamente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente o por inhalación.

45 Otra realización de la presente invención es una composición que comprende una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente o un ácido nucleico que codifica dicha construcción de polipéptido, o una composición como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Otra realización de la presente invención es un método de producción de un polipéptido como se ha descrito anteriormente, que comprende

- 55 (a) cultivar células huésped que comprenden ácido nucleico que puede codificar un polipéptido como se ha descrito anteriormente en condiciones que permitan la expresión del polipéptido, y,
(b) recuperar el polipéptido producido del cultivo.

Otra realización de la presente invención es un método como se ha descrito anteriormente, en el que dichas células huésped son bacterianas o levadura.

60 Otra realización de la presente invención es un método para tratar dispositivos médicos invasivos para prevenir la agregación mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión que comprende la etapa de recubrir dicho dispositivo con una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente.

65 Otra realización de la presente invención es un dispositivo médico invasivo para eludir la agregación mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión, en el que dicho dispositivo está recubierto con una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente.

Otra realización de la presente invención es un método de identificación de un agente que modula la agregación mediada por plaquetas que comprende

- 5 (a) poner en contacto una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente con un polipéptido correspondiente a su diana, o un fragmento del mismo, en presencia y ausencia de un candidato a modulador en condiciones que permitan la unión entre dichos polipéptidos, y
 10 (b) medir la unión entre los polipéptidos de la etapa (a), en el que una disminución en la unión en presencia de dicho candidato a modulador, con respecto a la unión en ausencia de dicho candidato a modulador identificó dicho candidato a modulador como un agente que modula la agregación mediada por plaquetas.

Otra realización de la presente invención es un kit para cribar agentes que modulan la agregación mediada por plaquetas según el método como se ha descrito anteriormente.

- 15 Otra realización de la presente invención es un método de diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por disfunción de la agregación mediada por plaquetas que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra con una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente,
 y
 20 (b) detectar la unión de dicha construcción de polipéptido a dicha muestra, y
 (c) comparar la unión detectada en la etapa (b) con un patrón, en el que una diferencia en la unión con respecto a dicha muestra es diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por disfunción de la agregación mediada por plaquetas.

- 25 Otra realización de la presente invención es un kit para cribar para diagnosticar una enfermedad o trastorno caracterizado por disfunción de la agregación mediada por plaquetas según el método como se ha descrito anteriormente.

- 30 Otra realización de la presente invención es un kit como se ha descrito anteriormente que comprende una construcción de polipéptido como se ha descrito anteriormente.

Descripción detallada

- 35 La presente invención se refiere a una construcción de polipéptido según la reivindicación 1 y el hallazgo de que la construcción tiene un efecto modulador sobre la agregación mediada por plaquetas.

Dianas

- 40 Según la invención, una diana es cualquiera de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, o dominio A3 de vWF. Dichas dianas son de mamífero, y se derivan de especies tales como conejos, cabras, ratones, ratas, vacas, terneros, camellos, llamas, monos, burros, cobayas, pollos, ovejas, perros, gatos, caballos, y preferentemente seres humanos. La secuencia de vWF humano se proporciona en la Tabla 30, SEC ID N.º: 48.

- 45 Una diana también es un fragmento de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, o dominio A3 de vWF, que puede provocar una respuesta inmunitaria. Una diana también es un fragmento de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, o dominio A3 de vWF, que pueden unirse a un anticuerpo de dominio único producido contra la diana de longitud completa 'progenitora'.

- 50 Un fragmento, como se usa en el presente documento, se refiere a menos del 100 % de la secuencia (por ejemplo, 99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, etc.), pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. Un fragmento es de longitud suficiente de forma que la interacción de interés se mantenga con afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.

- 55 Un fragmento, como se usa en el presente documento, también se refiere a inserciones, delecciones y sustituciones opcionales de uno o más aminoácidos que no alteran sustancialmente la capacidad de la diana para unirse a un anticuerpo de dominio único producido contra la diana natural. El número de inserciones delecciones o sustituciones de aminoácidos es preferentemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 aminoácidos.

- 60 Un anticuerpo de dominio único dirigido contra una diana significa anticuerpo de dominio único que puede unirse a su diana con una afinidad mejor de 10^{-6} M.

Anticuerpos de dominio único

- 65 Los anticuerpos de dominio único son anticuerpos cuyas regiones determinantes de la complementariedad son parte

de un polipéptido de dominio único. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadenas pesadas, anticuerpos que carecen naturalmente de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, anticuerpos manipulados y andamiajes de dominio único distintos de aquellos derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de la materia, o cualquier anticuerpo de dominio único futuro. Los anticuerpos de dominio único pueden derivarse de cualquier especie que incluye, pero no se limita a, ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo, bovina. Según un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único como se usa en el presente documento es un anticuerpo de dominio único que se produce naturalmente conocido como anticuerpo de cadenas pesadas que carece de cadenas ligeras. Tales anticuerpos de dominio único se desvelan, por ejemplo, en el documento WO 9404678. Por motivos de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadenas pesadas que carece naturalmente de cadena ligera se conoce en el presente documento como un *VHH* o *nanocuerpo* para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Una molécula de VHH tal puede derivarse de anticuerpos producidos en especies de *Camelidae*, por ejemplo, en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies, además de *Camelidae*, pueden producir anticuerpos de cadenas pesadas que carecen naturalmente de cadena ligera; tales VHH están dentro del alcance de la invención.

Los VHH, según la presente invención, y como es conocido por el destinatario experto, son dominios variables de la cadena pesada derivados de inmunoglobulinas que carecen naturalmente de cadenas ligeras tales como aquellas derivadas de *Camelidae* como se describe en el documento WO9404678 (y denominados en lo sucesivo dominios VHH o nanocuerpos). Las moléculas de VHH son aproximadamente 10x más pequeñas que las moléculas de IgG. Son polipéptidos individuales y muy estables, que resisten condiciones extremas de pH y temperatura. Además, son resistentes a la acción de proteasas, que no es el caso de anticuerpos convencionales. Además, la expresión *in vitro* de VHH produce VHH funcionales apropiadamente plegados de alto rendimiento. Además, los anticuerpos generados en camélidos reconocerán epítopes distintos de aquellos reconocidos por anticuerpos generados *in vitro* mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos o mediante inmunización de mamíferos distintos de camélidos (documento WO 9749805). Como tales, los VHH anti-albúmina pueden interaccionar de una forma más eficaz con la seroalbúmina que se sabe que es una proteína transportadora. Como proteína transportadora, algunos de los epítopes de la seroalbúmina pueden ser inaccesibles por proteínas unidas, péptidos y compuestos químicos pequeños. Como se sabe que los VHH se unen en epítopes 'inusuales' o no convencionales tales como cavidades (documentos WO9749805), puede aumentarse la afinidad de tales VHH por albúmina circulante.

Clases de VHH

La presente invención se refiere además a una construcción de polipéptido, en la que un anticuerpo de dominio único es un VHH dirigido a una diana mencionada en el presente documento, en la que el VHH pertenece a una clase que tiene secuencias de tipo humano. La clase se caracteriza porque los VHH llevan un aminoácido del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, treonina, asparagina o glutamina en la posición 45, tal como, por ejemplo, L45 según la numeración de Kabat. Una secuencia de VHH representada por SEC ID N.º: 1 y SEC ID N.º: 3 que se unen a vWF pertenecen a esta clase de tipo humano de polipéptidos de VHH. Como tales, los péptidos que pertenecen a esta clase muestran una alta homología de secuencias de aminoácidos con regiones estructurales VH humanas y dichos péptidos podrían administrarse a un ser humano directamente sin previsión de una respuesta inmunitaria no deseada del mismo, y sin la carga de humanización adicional.

Por tanto, un aspecto descrito en el presente documento permite la administración directa de una construcción de polipéptido que comprende uno o más anticuerpos de dominio único correspondientes a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 1 y 3 a un paciente en necesidad de la misma.

Otra clase de tipo humano de anticuerpos de dominio único de *Camelidae* representados por SEC ID N.º: 16 y 18 se ha descrito en el documento WO 03/035694 y contienen los residuos de FR2 hidrófobos normalmente encontrados en anticuerpos convencionales de origen humano o de otras especies, pero que compensan esta pérdida en hidrofilia por varios residuos tales como el residuo de arginina cargado, serina o residuos sin cargar tales como glicina en la posición 103 que sustituye el residuo de triptófano conservado presente en VH de anticuerpos bicatenarios. Como tales, los péptidos que pertenecen a estas dos clases muestran una alta homología de secuencias de aminoácidos con regiones estructurales VH humanas y dichos péptidos podrían administrarse a un ser humano directamente sin previsión de una respuesta inmunitaria no deseada del mismo, y sin la carga de humanización adicional.

Cualquiera de los VHH como se usa por la invención puede ser de la clase tradicional o de las clases de anticuerpos de *Camelidae* de tipo humano. Dichos anticuerpos pueden dirigirse contra dianas completas o un fragmento de las mismas. Estos polipéptidos incluyen los anticuerpos de *Camelidae* de longitud completa, concretamente los dominios Fc y VHH, versiones quiméricas de anticuerpos de *Camelidae* de cadenas pesadas con un dominio Fc humano.

El uno o más anticuerpos de dominio único de la construcción de polipéptido que están dirigidos contra una diana pueden ser de la misma secuencia. Alternativamente, pueden no todos tener la misma secuencia. Está dentro del alcance de la invención que una construcción de polipéptido comprenda anticuerpos anti-diana de dominio único que

no todos comparten la misma secuencia, pero que están dirigidos contra la misma diana, o fragmento de la misma, uno o más antígenos de la misma.

5 Es otro aspecto de la invención que la construcción de polipéptido comprenda dos o más anticuerpos de dominio único, en la que cualquiera de dos anticuerpos de dominio único están dirigidos contra diferentes dianas, es decir, contra cualquiera de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, dominio A3 de vWF, gpIb y colágeno.

10 Otro aspecto de la invención es una construcción de polipéptido biespecífica que comprende un anticuerpo de dominio único dirigido contra el dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, y otro anticuerpo de dominio único dirigido contra el dominio A3 de vWF. Dicha construcción de polipéptido biespecífica inhibe la interacción entre vWF y colágeno, y la interacción entre vWF y plaquetas.

15 Según un aspecto de la presente invención, una construcción de polipéptido puede comprender dos o más anticuerpos de dominio único que se han unido. Los anticuerpos de dominio único pueden ser idénticos en secuencia y dirigirse contra la misma diana o antígeno. Dependiendo del número de VHH ligados, un VHH multivalente puede ser bivalente (2 VHH), trivalente (3 VHH), tetravalente (4 VHH) o tener moléculas de una valencia mayor.

20 La presente invención también se refiere al hallazgo que una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento que comprende además uno o más anticuerpos de dominio único cada uno dirigido contra una proteína del suero de un sujeto, sorprendentemente tiene semivida significativamente prolongada en la circulación de dicho sujeto en comparación con la semivida del (de los) anticuerpo(s) de dominio único anti-diana cuando no es parte de dicha construcción. Además, se encontró que dichas construcciones presentaban las mismas propiedades favorables de VHH tales como alta estabilidad que permaneció intacta en ratones; resistencia a pH extremos, estabilidad a altas temperaturas y alta afinidad por diana.

Ejemplos de tales construcciones se representan por SEC ID N.º. 13 a 15, que comprenden VHH anti-vWF y VHH anti-seroalbúmina de ratón.

30 Por tanto, otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 13 a 15.

35 Otros ejemplos de tales construcciones se representan por SEC ID N.º. 42 a 45, que comprenden VHH anti-vWF humanizado y VHH anti-seroalbúmina de ratón.

Por tanto, otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 42 a 45.

40 La proteína del suero puede ser cualquier proteína adecuada encontrada en el suero de sujeto, o fragmento del mismo. En un aspecto de la invención, la proteína del suero es seroalbúmina, inmunoglobulinas del suero, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. Dependiendo del uso previsto tal como la semivida requerida para el tratamiento eficaz y/o la compartimentalización del antígeno diana, el componente de VHH puede dirigirse a una de las proteínas del suero anteriores.

45 Ejemplos de anticuerpos de dominio único dirigidos contra la seroalbúmina son las secuencias representadas por las secuencias correspondientes a cualquiera de SEC ID N.º: 16 a 19 y 49 a 61. Por tanto, otro aspecto de la invención es una construcción de polipéptido que comprende además uno o más anticuerpos de dominio único anti-suero, en la que la secuencia de un anticuerpo de dominio único anti-suero se corresponde con cualquiera representada por SEC ID N.º: 16 a 19 y 49 a 61.

50 Tales construcciones pueden circular en el suero del sujeto durante varios días, reduciendo la frecuencia de tratamiento, la molestia al sujeto y produciendo una disminución del coste del tratamiento. Además, es un aspecto de la invención que la semivida de las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento pueda controlarse por el número de anticuerpos de dominio único anti-proteína del suero presentes en la construcción. Se desea una semivida controlable en varias circunstancias, por ejemplo, en la aplicación de una dosis controlada de una construcción de polipéptido terapéutica.

60 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha mencionado en el presente documento, que comprende además un agente trombolítico.

Dicho agente trombolítico puede estar no covalentemente o covalentemente unido a un anticuerpo de dominio único mediante medios covalentes o no covalentes. Tales medios covalentes se describen a continuación. Medios no covalentes incluyen mediante una interacción de proteínas tales como biotina/estreptavidina, o mediante un inmunoconjugado.

65 Alternativamente, el agente trombolítico puede administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con

respecto a una construcción de polipéptido de la invención.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende al menos una construcción de polipéptido como se desvela en el presente documento y al menos un agente trombolítico, para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.

Un aspecto de la invención es una cantidad eficaz de al menos una construcción de polipéptido de la invención y al menos un agente trombolítico, para su uso en un método de tratamiento, administrando a un individuo simultáneamente, por separado o secuencialmente, de enfermedad autoinmunitaria.

Otro aspecto de la invención es un kit que contiene al menos una construcción de polipéptido de la invención y al menos un agente trombolítico para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto. Es un aspecto de la invención que el kit pueda usarse según la invención. Es un aspecto de la invención que el kit pueda usarse para tratar las enfermedades como se cita en el presente documento.

Por administración simultánea significa que el polipéptido y agente trombolítico se administran a un sujeto al mismo tiempo. Por ejemplo, como una mezcla o una composición que comprende dichos componentes. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una disolución administrada intravenosamente, un comprimido, líquido, crema tópica, etc., en la que cada preparación comprende los componentes de interés.

Por administración separada significa que el polipéptido y agente trombolítico se administran a un sujeto al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo. Los componentes están presentes en el kit como preparaciones sin mezclar separadas. Por ejemplo, el polipéptido y agente trombolítico pueden estar presentes en el kit como comprimidos individuales. Los comprimidos pueden administrarse al sujeto tragando ambos comprimidos al mismo tiempo, o un comprimido directamente tras el otro.

Por administración secuencial significa que el polipéptido y agente trombolítico se administran a un sujeto secuencialmente. El polipéptido y agente trombolítico están presentes en el kit como preparaciones sin mezclar separadas. Hay un intervalo de tiempo entre dosis. Por ejemplo, un componente podría administrarse hasta 336, 312, 288, 264, 240, 216, 192, 168, 144, 120, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1 o 0,5 horas después del otro componente.

En la administración secuencial, un componente puede administrarse una vez, o cualquier número de veces y en diversas dosis antes y/o después de la administración del otro componente. La administración secuencial puede combinarse con administración simultánea o secuencial.

Los usos médicos de la construcción de polipéptido descritos a continuación también se aplican a la composición que comprende una construcción de polipéptido como se desvela en el presente documento y al menos un agente trombolítico de polipéptido, para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto como se ha desvelado aquí anteriormente.

Los agentes trombolíticos según la invención pueden incluir, por ejemplo, estafilocinasa, activador tisular del plasminógeno, estreptocinasa, estreptocinasa monocatenaria, urocinasa y complejo acilado de plasminógeno-estreptocinasa.

Los anticuerpos de dominio único pueden unirse para formar cualquiera de las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento, que comprenden más de un anticuerpo de dominio único usando métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden fusionarse por reticulación química haciendo reaccionar residuos de aminoácidos con un agente de derivatización orgánica tal como se describe por Blattler et al., Biochemical 24,1517-1524; documento EP294703. Alternativamente, el anticuerpo de dominio único puede fusionarse genéticamente al nivel de ADN, es decir, una construcción de polinucleótido formada que codifica la construcción de polipéptido completa que comprende uno o más anticuerpos de dominio único anti-diana y uno o más anticuerpos de dominio único anti-proteína del suero. Un método para producir construcciones de polipéptido de VHH bivalente o multivalente se desvela en la solicitud de patente PCT WO 96/34103. Una forma de unir múltiples anticuerpos de dominio único es mediante la vía genética enlazando secuencias codificantes de anticuerpos de dominio único tanto directamente como mediante un conector peptídico. Por ejemplo, el extremo C del primer anticuerpo de dominio único puede ligarse al extremo N del siguiente anticuerpo de dominio único. Este modo de enlace puede extenderse con el fin de ligar anticuerpos de dominio único adicionales para la construcción y producción de construcciones tri-, tetra-, etc. funcionales.

Las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento pueden prepararse por el experto según métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden obtenerse VHH usando métodos conocidos en la técnica tales como inmunizando un camello y obteniendo hibridoma del mismo, o clonando una biblioteca de anticuerpos de dominio único usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y selección posterior usando expresión en fago.

Un aspecto descrito en el presente documento se refiere al hallazgo de que los polipéptidos representados por SEC ID N.º: 1 a 7 como en la Tabla 30 derivados de VHH de *Camelidae* se unen a vWF e inhiben su interacción con colágeno.

5 Por tanto, una realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 7.

10 Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 8 a 12. Dichas secuencias se corresponden con construcciones de polipéptido monoespecíficas (tales como en SEC ID N.º. 8 y 11) o construcciones de polipéptido heteroespecíficas que comprenden VHH de diferentes secuencias (tales como en SEC ID N.º. 9, 10 y 12), ambas dirigidas contra vWF.

15 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido que comprende uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos contra vWF, seleccionados de SEC ID N.º: 3, 5 y 7.

20 La agregación de plaquetas es un fenómeno muy complejo y en una situación *in vivo*, la interacción de vWF con colágeno solo tiene lugar a alto cizallamiento como se observa en arterias pequeñas. Para evaluar la agregación de plaquetas bajo alto cizallamiento (1600 s^{-1}), los inventores realizaron experimentos de perfusión. El Ejemplo 16 representa los datos de cizallamiento obtenidos con los ligantes de vWF-A3 específicos de SEC ID N.º. 1 a 12. Este experimento es representativo de las interacciones que tienen lugar tras el daño de la pared del vaso en una arteria pequeña (por ejemplo, durante angioplastia).

25 Sorprendentemente, los VHH monovalentes rinden muy bien en un experimento de agregación de plaquetas bajo alto cizallamiento: se obtuvo 50 % de inhibición de la agregación de plaquetas a una concentración entre 0,08 y 0,3 $\mu\text{g/ml}$. En comparación, el anticuerpo IgG específico para vWF que inhibe la interacción con colágeno, 82D6A3, inhibe el 50 % de la agregación de plaquetas a aproximadamente una concentración veinte veces mayor (Vanhoorelbeke K. et al., Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 37815-37821). Estos resultados fueron inesperados, dado que los valores de CI_{50} para los VHH monovalentes son hasta 7 veces peores en ELISA que el valor de CI_{50} de la IgG de 82D6A3.

30 Esto demuestra claramente que el gran tamaño de dichos anticuerpos no es adecuado para la interacción con macromoléculas que están empezando, o están en el proceso de agregación, tales como aquellas que participan en la agregación mediada por plaquetas. El vWF forma multímeros de hasta 60 monómeros (multímeros finales de hasta 20 millones de dalton de tamaño). De hecho, se ha mostrado que no todos los dominios A3 son accesibles a 82D6A3 (Dongmei WU, Blood, 2002, 99, 3623 a 3628). Además, el gran tamaño de los anticuerpos convencionales limitaría la penetración en el tejido, por ejemplo, durante la agregación mediada por plaquetas en el sitio de una pared del vaso dañado.

40 Los nanocuerpos tienen una estructura única que consiste en un único dominio variable. Moléculas de VHH derivadas de anticuerpos de *Camelidae* están entre los dominios de unión al antígeno intactos más pequeños conocidos (aproximadamente 15 kDa, o 10 veces más pequeños que una IgG convencional) y de ahí que sean muy adecuados para la administración a tejidos densos y para acceder al espacio limitado entre macromoléculas que participan en o que empiezan el proceso de agregación mediada por plaquetas.

50 A nuestro conocimiento, esta es la primera vez que los experimentos muestran que el pequeño tamaño de un nanocuerpo es ventajoso con respecto a un gran anticuerpo intacto para la inhibición de interacciones entre tales macromoléculas grandes.

A pesar del pequeño tamaño de los nanocuerpos, y así las ventajas de penetración, es todavía sorprendente que una molécula pequeña tal pueda inhibir las interacciones entre polímeros grandes tales como vWF (hasta 60 monómeros) y colágeno y con una alta eficiencia tal. Se ha descrito que solo las grandes formas multiméricas de vWF son hemostáticamente activas (Furtan, M., 1996, Ann. Hematol. 72:341-348). La unión de vWF multimérico a colágeno se produce con ~100 veces mayor afinidad que la unión de fragmentos de vWF monomérico.

60 Los resultados de los experimentos a alto cizallamiento indican que puede administrarse una menor dosis a los pacientes. Por tanto, se esperan menos efectos secundarios (tales como inmunogenicidad o problemas hemorrágicos).

También se describe el hallazgo de que los polipéptidos correspondientes a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º 23 a 31 de anticuerpos de llama de dominio único se unen al dominio A1 de vWF.

65 Por tanto, otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido que comprende uno o más anticuerpos de dominio único, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 23 a 31.

Otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 32 a 34. Dichas secuencias se corresponden con construcciones de polipéptido bivalentes que comprenden VHH de las mismas secuencias, ambos dirigidos contra el dominio A1 de vWF.

Los inventores han realizado experimento de perfusión en una cámara de flujo para estudiar el efecto de construcciones de polipéptido que comprenden secuencias representadas por SEC ID N.º: 23 a 31 tras la agregación de plaquetas bajo cizallamiento alto. El Ejemplo 25 proporciona datos de cizallamiento obtenidos con los ligantes de vWF-A1 específicos de SEC ID N.º. 23 a 31

También se describe el hallazgo de que los polipéptidos correspondientes a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º 62 a 65 de anticuerpos de llama de dominio único se unen selectivamente al dominio A1 de la conformación activa de vWF (tal como después de unirse a colágeno) en vez de a vWF inactivado libremente en circulación. Esto produce agentes antitrombóticos que son tanto más seguros como más eficaces. Como se usa en el presente documento, "unión selectiva" en referencia a dominios A1 de vWF significa que los anticuerpos de llama tienen al menos una afinidad de diez veces y preferentemente de cien veces mayor por la conformación activa de vWF en comparación con la forma inactivada.

Por tanto, otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido que comprende uno o más anticuerpos de dominio único, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 62 a 65.

En otra realización de la presente invención, una construcción de polipéptido comprende uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos a la misma diana, y comprende además uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos a la misma diana pero a un epítipo diferente en el mismo dominio.

Por ejemplo, las secuencias representadas por SEC ID N.º: 9, 10 y 12 son construcciones de polipéptido heteroespecíficas que comprenden VHH dirigidos a diferentes epítopes en el dominio A3 de vWF. Por tanto, otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 9, 10 y 12.

Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido en la que el número de anticuerpos de dominio único dirigidos a la misma diana es dos o más.

Las secuencias representadas por SEC ID N.º: 8 y 11 son construcciones de polipéptido que comprenden VHH dirigidos a los mismos epítopes en el dominio A3 de vWF en las que ambos VHH tienen secuencias idénticas. Por tanto, otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 8 y 11.

En otra realización de la presente invención, una construcción de polipéptido comprende uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos a un dominio de la misma diana, y uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos a la misma diana pero a otro dominio de la misma diana. Ejemplos de diferentes dominios podrían ser los dominios A1 y A3 de vWF

En otro ejemplo, las secuencias representadas por SEC ID N.º: 20, 21 y 22 son construcciones de polipéptido heteroespecíficas que comprenden VHH dirigidos a epítopes sobre diferentes dominios de vWF, es decir, A1 y A3 de vWF. Por tanto, otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 20, 21 y 22.

También se describe al menos un VHH dirigido al dominio A1 en una construcción de polipéptido heteroespecífica que reconoce la conformación activa de vWF. Un VHH tal se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 62 a 65.

Tales construcciones de polipéptido pueden tener efectos antitrombóticos superiores en comparación con los VHH monoméricos. Se realizaron experimentos de perfusión en una cámara de flujo para estudiar la agregación de plaquetas bajo alto cizallamiento para estudiar los efectos de estas construcciones de polipéptido. El Ejemplo 30 representa datos de cizallamiento obtenidos con la construcción de polipéptido heteroespecífica que comprende VHH anti-vWF-A1 y VHH anti-vWF-A3.

También se describe el hallazgo de que los polipéptidos representados por SEC ID N.º 35 a 37 de anticuerpos de llama de dominio único se unen a colágeno tipo I y/o tipo III.

Por tanto, otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 35 a 37.

En otra realización descrita en el presente documento, una construcción de polipéptido comprende uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos al colágeno I y/o tipo III, y uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos a la misma diana pero a un epítipo diferente en el mismo dominio. Las secuencias representadas por 3P1-31_3P2-31 y 3L-41_3P2-31 son construcciones de polipéptido heteroespecíficas que comprenden VHH dirigidos a diferentes epítopos en colágeno tipo I. Por tanto, otra realización descrita en el presente documento es una construcción de polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 46 y 47.

Otro aspecto descrito en el presente documento es una construcción de polipéptido que comprende uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos a la glicoproteína plaquetaria Ib.

Se desarrolló un anticuerpo monoclonal murino anti-vWF humano, AJvW-2 (IgG), que inhibía la interacción entre glicoproteína plaquetaria Ib (gplb) y factor de von Willebrand (vWF) durante la agregación inducida por ristocetina y botrocetina de plaquetas humanas (solicitud PCT número WO 00/10601). Fab de AJvW-2 inhibe la repetitiva trombosis de las arterias coronarias sin prolongación del tiempo de hemorragia en perros (Kageyama S et al., *Thromb Res.*, 2001 Mar 1;101(5):395-404) y previene la deposición de trombos y la formación de neointima después de la lesión con globo en cobayas (Kageyama S, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Oct;20(10):2303-8).

El anticuerpo 6B4 es un anticuerpo monoclonal (mAb) producido contra gplb humana purificada (solicitud PCT número WO 01/10911 A2). Cuando se inyecta en babuinos, la IgG intacta y sus fragmentos F(ab')₂ provocaron trombocitopenia casi inmediata, debido a la bivalencia de F(ab')₂ que media en la reticulación de plaquetas, o interacciones de Fc:receptor de Fc que median en la activación de la agregación de plaquetas (Cauwenberghs N. et al., *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2000, 20: 1347 y véase, por ejemplo, Cadroy Y et al., *Blood*, 1994, 83: 3218-3224, Becker BH et al., *Blood*, 1989, 74: 690-694, Ravanat C. et al., *Thromb. Haemost.* 1999, 82: 528a summary). Se inhibió la deposición de plaquetas sobre pericardio bovino rico en colágeno cuando los fragmentos Fab se inyectaron en los babuinos antes de generarse un trombo. Sin embargo, cuando los fragmentos Fab se inyectaron después de que se dejara formar un trombo, no se observó inhibición de la posterior trombosis.

Se mostró que la afinidad del fragmento Fab por el receptor de gplb sobre la plaqueta disminuyó un factor de 10 en comparación con la IgG intacta o F(ab')₂ (KD= 49,2 nM, 4,7 nM y 6,4 nM respectivamente). También el valor de Cl₅₀ para la agregación de plaquetas inducida por ristocetina fue hasta 10 veces peor para Fab en comparación con IgG o F(ab')₂ (Cl₅₀ de 40 nM, 4,5 nM y 7,7 nM, respectivamente).

Podría esperarse que la trombocitopenia no deseable producida por la activación mediada por Fc:receptor de Fc de la agregación de plaquetas y/o reticulación mediada por F(ab')₂ de plaquetas que se ha observado si se usa IgG intacta o F(ab')₂ terapéuticamente *in vivo* se evitara por el uso de VHH, ya que VHH no contiene Fc y no es bivalente. No se obtendrá pérdida de afinidad y actividad como se observa con el fragmento Fab de 6B4 ya que los nanocuerpos ya son moléculas de dominio único.

40 Anticuerpos humanizados

El descubrimiento de anticuerpos de dominio único que se producen naturalmente en llama, dromedario y camello reveló una nueva clase de moléculas terapéuticas que combinan las ventajas de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, especificidad, baja toxicidad, con las ventajas de moléculas pequeñas, por ejemplo, penetración en el tejido y estabilidad. Desafortunadamente, el desarrollo de productos terapéuticos apropiados basados en estas proteínas tiene el inconveniente de que se derivan de *Camelidae*, y así no de humano. Las proteínas no humanas contienen residuos de aminoácidos que pueden ser inmunogénicos cuando se inyectan en un paciente humano. Aunque los estudios han mostrado que los VHH derivados de *Camelidae* no son inmunogénicos cuando se inyectan en ratones, la sustitución de residuos de *Camelidae* con residuos humanos es preferible. Estos polipéptidos humanizados deben ser sustancialmente no inmunogénicos en seres humanos, pero retienen la afinidad y actividad del polipéptido natural.

Por humanizado se indica mutado de manera que la inmunogenicidad tras la administración en pacientes humanos es menor o inexistente. La humanización de un polipéptido, según la presente invención, comprende una etapa de sustituir uno o más de los aminoácidos de *Camelidae* con su homólogo humano como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin que el polipéptido pierda su carácter típico, es decir, la humanización no afecta significativamente la capacidad de unión del antígeno del polipéptido resultante.

Los inventores han determinado los residuos de aminoácidos del dominio variable de anticuerpo (VHH) que pueden modificarse sin disminuir la afinidad nativa del dominio por el antígeno y mientras que reducen su inmunogenicidad con respecto a una especie heteróloga; el uso de VHH que tienen modificaciones en los residuos identificados que son útiles para administración a especies heterólogas; y al VHH así modificado. Más específicamente, la invención se refiere a la preparación de VHH modificados que se modifican para la administración a seres humanos, los propios VHH resultantes y el uso de tales VHH "humanizados" en el tratamiento de enfermedades en seres humanos.

El inventor también ha encontrado que la humanización de polipéptidos de VHH requiere la introducción y mutagénesis de solo un número limitado de aminoácidos en una única cadena de polipéptidos sin pérdida espectacular de la actividad de unión y/o de inhibición. Esto es a diferencia de la humanización de scFv, Fab, (Fab)₂ e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en dos cadenas, la cadena ligera y la pesada, y la preservación del ensamblaje de ambas cadenas.

Puede realizarse una técnica de humanización por un método que comprende la sustitución de cualquiera de los siguientes residuos tanto solos como en combinación: posiciones FR1 1, 5, 28 y 30, el aminoácido distintivo en la posición 37, 44, 45 y 47 en FR2, residuos de FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94 y posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4; numeración según la numeración de Kabat. Ejemplos de tales secuencias humanizadas se dan en la Tabla 30, SEC ID N.º 2, 38 a 41.

Los polipéptidos representados en el Ejemplo 63 y 64 tienen un alto grado de homología con VH de la línea germinal humana DP-47. La humanización adicional requirió la introducción y mutagénesis de una cantidad limitada de aminoácidos en una única cadena de polipéptidos. Esto es a diferencia de la humanización de scFv, Fab, (Fab)₂ e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en dos cadenas, la cadena ligera y la pesada, y la preservación del ensamblaje de ambas cadenas.

Los polipéptidos contienen residuos de tipo humano en FR2. La humanización requirió mutagénesis de residuos en FR1 en la posición 1 y 5 que se introdujeron por el cebador usado para la clonación del repertorio y no se producen naturalmente en la secuencia de llama. La mutagénesis de aquellos residuos no produjo la pérdida de actividad de unión y/o de inhibición. La humanización de FR1 también requirió la mutagénesis de la posición 28 y 30. La mutagénesis de aquellos residuos tampoco produjo la pérdida de actividad de unión y/o de inhibición.

La humanización también requirió la mutagénesis de residuos en FR3 en la posición 74, 75, 76, 83, 84, 93, 94. La mutagénesis de aquellos residuos no produjo la pérdida de actividad de unión y/o de inhibición.

La humanización también requirió la mutagénesis de residuos en FR4 en la posición 104, 108 y 111. La mutagénesis de Q108L produjo menor nivel de producción en *Escherichia coli*. La posición 108 está expuesta a disolvente en VHH de camélido, mientras que en anticuerpos humanos esta posición está enterrada en la interfase VH-VL (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). En VH aislados, la posición 108 está expuesta a disolvente. La introducción de una Leu hidrófoba apolar en lugar de Gln sin carga polar puede tener un espectacular efecto sobre la capacidad de plegamiento intrínseca/estabilidad de la molécula.

Una realización de la presente invención es un método para humanizar un VHH que comprende las etapas de:

- (a) sustituir cualquiera de los siguientes residuos tanto solos como en combinación:
 posiciones FR1 1, 5, 28 y 30,
 el aminoácido distintivo en la posición 37, 44, 45 y 47 en FR2,
 residuos de FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94,
 y posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4;

numeración según la numeración de Kabat.

Ejemplos de tales secuencias humanizadas se facilitan en la Tabla 30, SEC ID N.º 2, 38 a 41.

El uso de anticuerpos derivados de fuentes tales como ratón, oveja, cabra, conejo, etc., y derivados humanizados de los mismos, como tratamiento para condiciones que requieren una modulación de la agregación asociada a plaquetas es problemático por varios motivos. Los anticuerpos tradicionales no son estables a temperatura ambiente, y tienen que ser refrigerados para la preparación y almacenamiento, requiriendo equipo de laboratorio refrigerado necesario, almacenamiento y transporte, que contribuyen a tiempo y gastos. La refrigeración no es algunas veces factible en países en desarrollo. Los rendimientos de expresión de dichas moléculas de Fab son muy bajos y el método de producción es muy laborioso. Además, la fabricación o producción a pequeña escala de dichos anticuerpos es cara debido a que los sistemas celulares de mamíferos necesarios para la expresión de anticuerpos intactos y activos requieren altos niveles de apoyo en términos de tiempo y equipo, y los rendimientos son muy bajos. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende del pH, y de ahí que sean inadecuados para su uso en entornos fuera del intervalo de pH fisiológico usual tal como, por ejemplo, en el tratamiento de hemorragia gástrica, cirugía gástrica. Además, los anticuerpos tradicionales son inestables a bajo o alto pH y de ahí que no sean adecuados para administración por vía oral. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos de camélido resisten condiciones adversas, tales como pH extremo, reactivos desnaturizantes y altas temperaturas (Ewert S et al., *Biochemistry* 2002 Mar 19;41(11):3628-36), haciendo de ellos adecuados para la administración por administración por vía oral. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende de la temperatura, y de ahí que no sean adecuados para su uso en ensayos o kits realizados a temperaturas fuera de los intervalos de temperatura biológicamente activos (por ejemplo, 37 ± 20 °C).

Las construcciones de polipéptido representadas por SEC ID N.º: 1 a 47 y 49 a 65 y sus derivados no solo poseen las ventajosas características de anticuerpos convencionales, tales como baja toxicidad y alta selectividad, sino que también presentan propiedades adicionales. Son más solubles, que significa que pueden almacenarse y/o

administrarse a mayores concentraciones en comparación con los anticuerpos convencionales. Son estables a temperatura ambiente, que significa que pueden prepararse, almacenarse y/o transportarse sin el uso de equipo de refrigeración, que lleva a ahorros de costes, tiempo y medioambientales (descritos en el Ejemplo 61). Otras características ventajosas en comparación con los anticuerpos convencionales incluyen semivida corta en la circulación que puede modularse según la invención por, por ejemplo, acoplamiento a albúmina, un nanocuerpo biespecífico con una especificidad contra la albúmina y la otra contra la diana, acoplamiento de Fc, acoplamiento de VHH (VHH bivalentes) o por pegilación (descritos en el Ejemplo 41 hasta 54). Se desea una semivida corta y controlable para procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, que requieren una inhibición de la agregación mediada por plaquetas durante un periodo de tiempo limitado. Por tanto, cuando se producen problemas hemorrágicos u otras complicaciones, la dosificación puede reducirse inmediatamente. Los polipéptidos de la presente invención también retienen la actividad de unión a un pH y temperatura fuera de aquellos de los intervalos fisiológicos usuales, que significa que pueden ser útiles en situaciones de pH y temperatura extremos que requieren una modulación de la agregación mediada por plaquetas, tales como en cirugía gástrica, control de hemorragia gástrica, ensayos realizados a temperatura ambiente, etc. Los polipéptidos de la presente invención también presentan una estabilidad prolongada en extremos de pH, que significa que serían adecuados para la administración por administración por vía oral. Los polipéptidos de la presente invención pueden producirse rentablemente mediante la fermentación en organismos recombinantes huésped convenientes tales como *Escherichia coli* y levadura; a diferencia de los anticuerpos convencionales que también requieren caras instalaciones de cultivo de células de mamífero, los niveles de expresión que pueden conseguirse son altos. Ejemplos de rendimientos de los polipéptidos de la presente invención son 1 a 10 mg/ml (*E. coli*) y hasta 1 g/l (levadura). Los polipéptidos de la presente invención también presentan alta afinidad de unión por un amplio intervalo de diferentes tipos de antígeno, y la capacidad para unirse a epítopes no reconocidos por anticuerpos convencionales; por ejemplo, muestran largas estructuras de bucle basadas en CDR con la posibilidad de penetrar en cavidades y presentan inhibición de la función enzimática. Además, como la unión se produce frecuentemente mediante el bucle de CDR3 solo, se prevé que los péptidos derivados de CDR3 puedan usarse terapéuticamente (Desmyter et al., J Biol Chem, 2001, 276: 26285-90). La preparación de tal péptido se describe en el Ejemplo 65. Los polipéptidos de la invención también pueden retener la capacidad de unión completa como proteína de fusión con una enzima o toxina. Además, podría esperarse que la trombocitopenia no deseable producida por la activación mediada por Fc:receptor de Fc de la agregación de plaquetas y/o reticulación mediada por F(ab')₂ de plaquetas que se ha observado si se usa IgG intacta o F(ab')₂ terapéuticamente *in vivo* (véase Cauwenberghs N. et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 2000, 20: 1347) se evitara en el uso de VHH, ya que VHH no contiene Fc y no es bivalente. Así, los polipéptidos representados por SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 47, 62 a 65, homólogos o porciones funcionales de los mismos proporcionan un ahorro considerable de costes y de tiempo en el tratamiento y diagnóstico de afecciones relacionadas con la agregación mediada por plaquetas, y el paciente en necesidad de dichos polipéptidos se encontraría con menos de los problemas asociados a agentes convencionales.

La agregación mediada por plaquetas es el proceso en el que el colágeno unido a vWF se adhiere a plaquetas y/o receptores de plaquetas (ejemplos de ambos son gpl^a/IIa, gpl^b o colágeno), produciendo por último lugar la activación de plaquetas. La activación de plaquetas conduce a la unión a fibrinógeno, y finalmente a la agregación de plaquetas. Está dentro del alcance de la presente invención proporcionar polipéptidos que modulen los procesos que comprenden la agregación mediada por plaquetas, tales como unión vWF-colágeno, adhesión de vWF-receptor de plaquetas, adhesión de colágeno-receptor de plaquetas, activación de plaquetas, unión a fibrinógeno y/o agregación de plaquetas. Dichos polipéptidos se derivan de anticuerpos de *Camelidae* dirigidos hacia vWF, A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado o dominios A3, gpl^b o colágeno, y comparten las mismas ventajas que los polipéptidos representados por SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 47 y 62 a 65, como se ha descrito anteriormente.

Según un aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de una construcción de polipéptido de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede ser una porción funcional de una construcción de polipéptido de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de una construcción de polipéptido de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de una construcción de polipéptido de longitud completa. Según un aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede comprender una secuencia de una construcción de polipéptido.

Según un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único usado para formar una construcción de polipéptido puede ser un anticuerpo de dominio único completo (por ejemplo, un VHH) o una secuencia homóloga del mismo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único usado para formar la construcción de polipéptido puede ser una porción funcional de un anticuerpo de dominio único completo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único usado para formar la construcción de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de un anticuerpo de dominio único completo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único usado para formar la construcción de polipéptido puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un anticuerpo de dominio único completo.

Otro aspecto descrito en el presente documento son los anticuerpos de dominio único correspondientes a cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 7, 16 a 19, 23 a 31, 35, a 41, y 49 a 65, una secuencia homóloga de las mismas, y/o una porción funcional de las mismas.

Según otro aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de la secuencia parental. Según otro aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede ser una porción funcional de la secuencia parental. Según otro aspecto de la invención, una construcción de polipéptido puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de la secuencia parental.

Como se usa en el presente documento, una secuencia homóloga puede comprender adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos, que no alteran sustancialmente las características funcionales del polipéptido. El número de deleciones o sustituciones de aminoácidos es preferentemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 aminoácidos.

Una secuencia homóloga según la presente invención incluye polipéptidos extendidos mediante la adición de aminoácidos para formar anticuerpo humano de cadenas pesadas o anticuerpo humano de cadenas pesadas de dominio único, que no alteran sustancialmente las características funcionales del polipéptido sin modificar.

Una secuencia homóloga descrita en el presente documento puede incluir un polipéptido representado por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 47 y 49 a 65, que se ha humanizado (como se describe en los Ejemplos 63 y 64).

Una secuencia homóloga descrita en el presente documento puede incluir una secuencia correspondiente a la secuencia de cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 47 y 49 a 65 que existe en otras especies de *Camelidae* tales como, por ejemplo, camello, llama, dromedario, alpaca, guanaco, etc.

Si la secuencia homóloga indica identidad de secuencias, significa una secuencia que presenta una alta identidad de secuencias (superior al 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad de secuencias) con la secuencia parental, y se caracteriza preferentemente por propiedades similares de la secuencia parental, concretamente afinidad, calculándose dicha identidad usando métodos conocidos.

Alternativamente, una secuencia homóloga también puede ser cualquier secuencia de aminoácidos resultante de sustituciones permitidas en cualquier número de posiciones de la secuencia parental según la siguiente fórmula:

Ser sustituida con Ser, Thr, Gly y Asn;
 Arg sustituida con una de Arg, His, Gln, Lys y Glu;
 Leu sustituida con una de Leu, Ile, Phe, Tyr, Met y Val;
 Pro sustituida con una de Pro, Gly, Ala y Thr;
 Thr sustituida con una de Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His y Gln;
 Ala sustituida con una de Ala, Gly, Thr y Pro;
 Val sustituida con una de Val, Met, Tyr, Phe, Ile y Leu;
 Gly sustituida con una de Gly, Ala, Thr, Pro y Ser;
 Ile sustituida con una de Ile, Met, Tyr, Phe, Val y Leu;
 Phe sustituida con una de Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val y Leu;
 Tyr sustituida con una de Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val y Leu;
 His sustituida con una de His, Glu, Lys, Gln, Thr y Arg;
 Gln sustituida con una de Gln, Glu, Lys, Asn, His, Thr y Arg;
 Asn sustituida con una de Asn, Glu, Asp, Gln y Ser;
 Lys sustituida con una de Lys, Glu, Gln, His y Arg;
 Asp sustituida con una de Asp, Glu y Asn;
 Glu sustituido con una de Glu, Asp, Lys, Asn, Gln, His y Arg;
 Met sustituida con una de Met, Phe, Ile, Val, Leu y Tyr.

Un homólogo según la presente invención puede referirse a secuencias de nucleótidos de más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 o 1000 nucleótidos capaces de hibridarse con el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que puede codificar un polipéptido bajo condiciones de hibridación rigurosas (tales como las descritas por SAMBROOK et al., *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, Cold Spring, Harbor Laboratory Press, New York).

Como se usa en el presente documento, una porción funcional se refiere a un anticuerpo de dominio único de longitud suficiente de forma que la interacción de interés se mantenga con afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.

Alternativamente, una porción funcional de un anticuerpo de dominio único de la invención comprende una deleción parcial de la secuencia de aminoácidos completa y todavía mantiene el (los) sitio(s) de unión y dominio(s) de proteína necesarios para la unión de e interacción con la diana.

Alternativamente, una porción funcional de cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 7 es un polipéptido que comprende una deleción parcial de la secuencia de aminoácidos completa y que todavía mantiene el (los) sitio(s) de unión y dominio(s) de proteína necesarios para la inhibición de la unión de vWF a colágeno.

Alternativamente, una porción funcional de cualquiera de SEC ID N.º: 23 a 31 y 62 a 65 es un polipéptido que comprende una delección parcial de la secuencia de aminoácidos completa y que todavía mantiene el (los) sitio(s) de unión y dominio(s) de proteína necesarios para la unión de e interacción con el dominio A1 de vWF.

5 Alternativamente, una porción funcional de cualquiera de SEC ID N.º: 35 a 37 es un polipéptido que comprende una delección parcial de la secuencia de aminoácidos completa y que todavía mantiene el (los) sitio(s) de unión y dominio(s) de proteína necesarios para la unión de e interacción con colágeno.

10 Alternativamente, una porción funcional comprende una delección parcial de la secuencia de aminoácidos completa de un polipéptido y que todavía mantiene el (los) sitio(s) de unión y dominio(s) de proteína necesarios para la unión de e interacción con el antígeno contra el que se produjo. Incluye, pero no se limita a, los dominios VHH.

15 Como se usa en el presente documento, una porción funcional como se refiere a una secuencia de polipéptidos se refiere a menos del 100 % de la secuencia (por ejemplo, 99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 % 50 %, etc.), pero que comprende 5 o más aminoácidos.

20 Una porción como se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptidos se refiere a menos del 100 % de la secuencia (por ejemplo, 99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 % 50 %, etc.), pero que comprende 15 o más nucleótidos.

25 Un aspecto de la presente invención es la administración de una construcción de polipéptido según la invención que puede evitar la necesidad de inyección. Los terapéuticos basados en anticuerpos convencionales tienen un potencial significativo como fármacos debido a que tienen exquisita especificidad por su diana y una baja toxicidad inherente; sin embargo, tienen un inconveniente importante: son relativamente inestables, y son sensibles a la degradación por proteasas. Mediante cualquier medio convencional, los fármacos de anticuerpo no pueden administrarse por vía oral, sublingualmente, tópicamente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente o por inhalación debido a que no son resistentes al bajo pH en estos sitios, la acción de proteasas en estos sitios y en la sangre y/o debido a su gran tamaño. Tienen que administrarse mediante inyección (intravenosamente, subcutáneamente, etc.) para vencer algunos de estos problemas. La administración mediante inyección requiere entrenamiento por especialista con el fin de usar una jeringa hipodérmica o aguja correctamente y con seguridad. Requiere adicionalmente equipo estéril, una formulación líquida del polipéptido terapéutico, embalaje de viales de dicho polipéptido en una forma estéril y estable y, del sujeto, un sitio adecuado para la entrada de la aguja. Además, los sujetos comúnmente experimentan estrés físico y psicológico antes y después de recibir una inyección.

35 Un aspecto de la presente invención vence estos problemas del estado de la técnica, proporcionando las construcciones de polipéptido de la presente invención. Dichas construcciones son suficientemente pequeñas, resistentes y estables para ser administradas por vía oral, sublingualmente, tópicamente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente o por inhalación sustancial sin pérdida de actividad. Las construcciones de polipéptido de la presente invención evitan la necesidad de inyecciones, no solo ahorran costes/tiempo, sino que también son más convenientes y más cómodas para el sujeto.

45 Una realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través del entorno gástrico sin que se inactive la sustancia.

50 Como es conocido por expertos en la materia, una vez en posesión de dicha construcción de polipéptido, la tecnología de formulación puede aplicarse a liberar una cantidad máxima de polipéptido en la localización correcta (en el estómago, en el colon, etc.). Este método de administración es importante para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos cuyas dianas están localizadas en el sistema del intestino.

55 Un aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, administrando por vía oral a un sujeto, los síntomas de un trastorno susceptible a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través del entorno gástrico sin ser inactivada.

60 Otra realización de la presente invención es un uso de una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través del entorno gástrico sin ser inactivada.

65 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al sistema del intestino sin ser inactivada dicha sustancia, administrando por vía oral a un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la circulación sanguínea de un sujeto sin ser inactivada la sustancia, administrando por vía oral a un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

5 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas o trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada al tracto vaginal y/o rectal.

10 En un ejemplo no limitante, una formulación según la invención comprende una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, en forma de un gel, crema, supositorio, película, o en forma de una esponja o como un anillo vaginal que libera lentamente el principio activo con el tiempo (tales formulaciones se describen en los documentos EP 707473, EP 684814, US 5629001).

15 Un aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, administrando vaginalmente y/o rectalmente a un sujeto, los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada al tracto vaginal y/o rectal.

20 Otra realización de la presente invención es un uso de una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada al tracto vaginal y/o rectal.

25 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al tracto vaginal y/o rectal sin ser inactivada dicha sustancia, administrando al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

30 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la circulación sanguínea de un sujeto sin ser inactivada dicha sustancia, administrando al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

35 Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón.

40 En un ejemplo no limitante, una formulación según la invención comprende una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento en forma de un spray nasal (por ejemplo, un aerosol) o inhalador. Como la construcción de polipéptido es pequeña, puede alcanzar su diana mucho más eficazmente que la moléculas de IgG terapéuticas.

45 Un aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, administrando a un sujeto por inhalación mediante la boca o nariz, los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a las vías respiratorias superiores y pulmón.

50 Otra realización de la presente invención es un uso de una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón, sin ser inactivado dicho polipéptido.

55 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la nariz, vías respiratorias superiores y pulmón sin inactivación, administrando a la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón de un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

60 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la circulación sanguínea de un sujeto sin inactivación administrando a la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón de un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

65 Una realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la mucosa intestinal, en la que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal. Debido a su pequeño tamaño,

una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento puede pasar a través de la mucosa intestinal y llegar a la circulación sanguínea más eficazmente en sujetos que padecen trastornos que producen un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal.

5 Un aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, administrando por vía oral a un sujeto, los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la mucosa intestinal, en la que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

10 Este proceso puede incluso potenciarse adicionalmente por un aspecto adicional de la presente invención - el uso de vehículos de transporte activo. En este aspecto de la invención, el VHH está fusionado con un vehículo que potencia la transferencia a través de la pared intestinal en la circulación sanguínea. En un ejemplo no limitante, este "vehículo" es un segundo VHH que está fusionado con el VHH terapéutico. Tales construcciones de fusión se hacen usando métodos conocidos en la técnica. El VHH "vehículo" se une específicamente a un receptor sobre la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

15 Otra realización de la presente invención es un uso de una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

20 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la mucosa intestinal sin ser inactivada, administrando por vía oral a un sujeto una construcción de polipéptido de la invención.

25 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la circulación sanguínea de un sujeto sin ser inactivada, administrando por vía oral a un sujeto una construcción de polipéptido de la invención.

30 Este proceso puede incluso potenciarse adicionalmente por un aspecto adicional de la presente invención - el uso de vehículos de transporte activo. En este aspecto de la invención, una construcción de polipéptido como se describe en el presente documento se fusiona con un vehículo que potencia la transferencia a través de la pared intestinal en la circulación sanguínea. En un ejemplo no limitante, este "vehículo" es un VHH que está fusionado con dicho polipéptido. Tales construcciones de fusión se hacen usando métodos conocidos en la técnica. El VHH "vehículo" se une específicamente a un receptor sobre la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

35 Una realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través de los tejidos por debajo de la lengua eficazmente. Una formulación de dicha construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, por ejemplo, un comprimido, espray, gota, se coloca debajo de la lengua y se adsorbe a través de las membranas mucosas en la red de capilares debajo de la lengua.

40 Un aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, administrando sublingualmente a un sujeto, los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través de los tejidos debajo de la lengua eficazmente.

45 Otra realización de la presente invención es un uso de una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través de los tejidos debajo de la lengua.

50 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a los tejidos debajo de la lengua sin ser inactivada, administrando sublingualmente a un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

55 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la circulación sanguínea de un sujeto sin ser inactivada, administrando por vía oral a un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

60 Una realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través de la piel eficazmente.

65

Una formulación de dicha construcción de polipéptido, por ejemplo, una crema, película, espray, gota, parche, se coloca sobre la piel y pasa a través.

5 Un aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, administrando tópicamente a un sujeto, los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través de la piel eficazmente.

10 Otra realización de la presente invención es un uso de una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que puede pasar a través de la piel eficazmente.

15 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la piel sin ser inactivada, administrando tópicamente a un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

20 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la circulación sanguínea de un sujeto, administrando tópicamente a un sujeto una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento.

25 En otra realización de la presente invención, una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento comprende además un anticuerpo de dominio único portador (por ejemplo, VHH) que actúa de vehículo de transporte activo para el transporte de dicha construcción de polipéptido mediante la luz del pulmón a la sangre.

30 Una construcción de polipéptido que comprende además un vehículo que se une específicamente a un receptor presente sobre la superficie de la mucosa (células epiteliales bronquiales) produciendo el transporte activo del polipéptido de la luz del pulmón a la sangre. El anticuerpo de dominio único transportador puede fusionarse con la construcción de polipéptido. Tales construcciones de fusión se hicieron usando métodos conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. El anticuerpo de dominio único "transportador" se une específicamente a un receptor sobre la superficie de la mucosa que induce una transferencia activa a través de la superficie.

35 Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar qué anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VHH) son activamente transportados en la circulación sanguínea tras la administración nasal. Similarmente, una biblioteca de fagos de VHH sin tratamiento previo o inmunitaria puede administrarse nasalmente, y después de diferentes momentos de tiempo después de la administración, la sangre u órganos pueden aislarse para rescatar fagos que se han transportado activamente a la circulación sanguínea. Un ejemplo no limitante de un receptor para el transporte activo de la luz del pulmón a la circulación sanguínea es el receptor de Fc N (FcRn). Un aspecto de la invención incluye las moléculas de VHH identificadas por el método. Tales VHH pueden entonces usarse como VHH
40 transportador para la administración de un VHH terapéutico a la diana correspondiente en la circulación sanguínea tras la administración nasal.

45 Una realización de la presente invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma. Dichos trastornos incluyen púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho inestable o estable, infarto cerebral, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis. Dichos trastornos incluyen adicionalmente aquellos que surgen de injerto de derivación coronaria, valvuloplastia de la arteria coronaria e intervenciones coronarias tales como angioplastia, implantación de endoprótesis vascular o aterectomía.

50 Otros trastornos son cualquiera de formación de un trombo no oclusivo, formación de un trombo oclusivo, formación de trombo arterial, oclusión coronaria aguda, reestenosis, reestenosis después de PCTA o implantación de endoprótesis vascular, formación de trombo en arterias estenosadas, hiperplasia después de angioplastia, aterectomía o implantación de endoprótesis arterial, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de las arterias enfermas.

55 Un aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos o afecciones relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma, en la que dicha construcción de polipéptido se administra intravenosamente, subcutáneamente, por vía oral, sublingualmente, tópicamente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente o por inhalación.

60 Otro aspecto de la invención es el uso de una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos o afecciones relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma, en el que dicha construcción de polipéptido se administra intravenosamente, subcutáneamente, por vía oral, sublingualmente, tópicamente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente o por inhalación.

Otro aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento, para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, que comprende administrar a un sujeto dicha construcción de polipéptido heteroespecífica intravenosamente, subcutáneamente, por vía oral, sublingualmente, tópicamente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente o por inhalación, trastornos o afecciones relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma.

Otro aspecto de la invención es una construcción de polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos o afecciones relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma.

Otro aspecto de la invención es un uso de un polipéptido como se ha desvelado en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos o afecciones relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma.

Puede usarse una construcción de polipéptido de la presente invención con el fin de cribar agentes que modulan la unión del polipéptido a un vWF (o gplb o colágeno). Cuando se identifican en un ensayo que mide la unión o dicho desplazamiento de polipéptido solo, los agentes tendrán que someterse a prueba funcional para determinar si actúan de moduladores de la agregación mediada por plaquetas.

En un ejemplo de un experimento de desplazamiento, fago o células que expresan vWF o un fragmento del mismo se incuban en tampón de unión con, por ejemplo, un polipéptido representado por SEC ID N.º: 1 que se ha marcado, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un candidato a modulador. Para validar y calibrar el ensayo, pueden realizarse reacciones de competición de control usando concentraciones crecientes de dicho polipéptido y que está sin marcar. Después de la incubación, las células se lavan ampliamente, y el polipéptido marcado unido se mide según convenga para la marca dada (por ejemplo, recuento por centelleo, fluorescencia, etc.). Una disminución de al menos el 10 % en la cantidad de polipéptido marcado unido en presencia de candidato a modulador indica el desplazamiento de la unión por el candidato a modulador. Se considera que los candidatos a modulador se unen específicamente en este u otros ensayos descritos en el presente documento si desplaza el 50 % de polipéptido marcado (dosis de polipéptido inferior a la saturación) a una concentración de 1 μ M o menos. Por supuesto, el método anterior podría aplicarse fácilmente para el cribado de candidatos a modulador que alteran la unión entre los polipéptidos representados por SEC ID N.º: 2 a 15, 20 a 47 y 62 a 65 o las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento, y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb o colágeno, o un fragmento de las mismas.

Alternativamente, la unión o desplazamiento de la unión puede monitorizarse por resonancia de plasmones superficiales (SPR). Pueden usarse ensayos de resonancia de plasmones superficiales como método cuantitativo para medir la unión entre dos moléculas por el cambio en la masa cerca de un sensor inmovilizado producida por la unión o pérdida de unión de, por ejemplo, el polipéptido representado por SEC ID N.º: 1 de la fase acuosa a un vWF, o fragmento del mismo inmovilizado en una membrana sobre el sensor. Este cambio en la masa se mide como unidades de resonancia frente al tiempo después de la inyección o eliminación de dicho polipéptido o candidato a modulador y se mide usando un Biacore Biosensor (Biacore AB). El vWF, o fragmento del mismo, puede inmovilizarse, por ejemplo, sobre un chip sensor (por ejemplo, chip CM5 de calidad para investigación; Biacore AB) en una delgada membrana de lípidos de película según métodos descritos por Salamon et al. (Salamon et al., 1996, *Biophys. J.* 71: 283-294; Salamon et al., 2001, *Biophys. J.* 80: 1557-1567; Salamon et al., 1999, *Trends Biochem. Sci.* 24: 213-219). Sarrío *et al.* demostraron que SPR puede usarse para detectar la unión del ligando al receptor de adenosina GPCR A(1) inmovilizado en una capa de lípido sobre el chip (Sarrío et al., 2000, *Mol. Cell. Biol.* 20: 5164-5174). Condiciones para la unión de una construcción de polipéptido de la invención en un ensayo de SPR pueden ajustarse por un experto en la materia usando las condiciones informadas por Sarrío *et al.* como punto de partida. Por supuesto, el método anterior podría aplicarse fácilmente para cribar candidatos a modulador que alteran la unión entre las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb o colágeno, o un fragmento de las mismas.

SPR puede ensayar moduladores de la unión en al menos dos formas. Primera, un polipéptido representado por SEC ID N.º: 1, por ejemplo, puede unirse previamente para inmovilizar vWF, o fragmento del mismo, seguido de inyección del candidato a modulador a una concentración que oscila de 0,1 nM a 1 μ M. El desplazamiento del polipéptido unido puede cuantificarse, permitiendo la detección de la unión del modulador. Alternativamente, el vWF unido a membrana, o fragmento del mismo, puede incubarse previamente con un candidato a modulador y exponerse a, por ejemplo, un polipéptido representado por SEC ID N.º: 1. Una diferencia en la afinidad de unión entre dicho polipéptido y vWF, o fragmento del mismo previamente incubado con el modulador, en comparación con aquella entre dicho polipéptido y vWF, o fragmento del mismo, en ausencia del modulador demostrará la unión o desplazamiento de dicho polipéptido en presencia de modulador. En cualquier ensayo, una disminución del 10 % o más en la cantidad de dicho polipéptido unido en presencia de candidato a modulador, con respecto a la cantidad de dicho polipéptido unido en ausencia de candidato a modulador, indica que el candidato a modulador inhibe la interacción de vWF, o fragmento del mismo, y dicho polipéptido. Por supuesto, el método anterior podría aplicarse fácilmente para cribar candidatos a modulador que alteran la unión entre los polipéptidos representados por

SEC ID N.º: 2 a 15, 20 a 47 y 62 a 65 o las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento, y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb, o colágeno, o un fragmento de los mismos.

5 Otro método de detección de la inhibición de la unión de, por ejemplo, un polipéptido representado por SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 34, 38 a 45 o 62 a 65 a vWF, o fragmentos del mismo, usa transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un fenómeno mecánico cuántico que se produce entre un donante de fluorescencia (D) y un aceptor de fluorescencia (A) en estrecha proximidad entre sí (normalmente < 100 Å de separación) si el espectro de emisión de D se solapa con el espectro de excitación de A. Las moléculas que van a probarse, por ejemplo, un polipéptido representado por SEC ID N.º: 1 y un vWF, o fragmento del mismo, se marcan con un par complementario de fluoróforos donante y aceptor. Aunque están estrechamente unidos juntos por la interacción vWF : polipéptido, la fluorescencia emitida tras la excitación del fluoróforo donante tendrá una longitud de onda diferente de la emitida en respuesta a esa longitud de onda de excitación cuando dicho polipéptido y vWF, o fragmento del mismo, no están unidos, proporcionando la cuantificación de moléculas unidas frente a sin unir por medición de la intensidad de emisión a cada longitud de onda. Los fluoróforos donantes con los que marcar el vWF, o fragmento del mismo, son muy conocidos en la técnica. De particular interés son variantes de la GFP de *A. victoria* conocida como FP cian (CFP, donante (D)) y FP amarilla (YFP, aceptor (A)). Como un ejemplo, la variante de YFP puede prepararse como una proteína de fusión con vWF, o fragmento del mismo. Se conocen en la técnica vectores para la expresión de variantes de GFP como fusiones (Clontech), además de reactivos marcados con fluoróforo (Molecular Probes). La adición de un candidato a modulador a la mezcla de polipéptido fluorescentemente marcado y YFP-vWF producirá una inhibición de la transferencia de energía demostrada por, por ejemplo, una disminución en la fluorescencia de YFP con respecto a una muestra sin el candidato a modulador. En un ensayo usando FRET para la detección de la interacción vWF : polipéptido, una disminución del 10 % o mayor en la intensidad de la emisión fluorescente a la longitud de onda del aceptor en muestras que contienen un candidato a modulador, con respecto a muestras sin el candidato a modulador, indica que el candidato a modulador inhibe la interacción de vWF:polipéptido. Por supuesto, el método anterior podría aplicarse fácilmente para cribar candidatos a modulador que alteran la unión entre los polipéptidos representados por cualquiera de SEC ID N.º: 2 a 15, 20 a 47, 62 a 65 o las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento, y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb o colágeno, o un fragmento de los mismos.

30 Una variación en FRET usa extinción de fluorescencia para monitorizar interacciones moleculares. Una molécula en el par de interacción puede marcarse con un fluoróforo, y la otra con una molécula que extingue la fluorescencia del fluoróforo cuando se pone en estrecha yuxtaposición con él. Un cambio en la fluorescencia tras la excitación es indicativo de un cambio en la asociación de las moléculas marcadas con el par fluoróforo:extintor. Generalmente, un aumento en la fluorescencia de vWF marcado, o fragmento del mismo, es indicativo de que la molécula de polipéptido (por ejemplo, una construcción de polipéptido de la invención) que lleva el extintor se ha desplazado. Para ensayos de extinción, un aumento del 10 % o mayor en la intensidad de la emisión fluorescente en muestras que contienen un candidato a modulador, con respecto a muestras sin el candidato a modulador, indica que el candidato a modulador inhibe la interacción vWF : polipéptido. Por supuesto, el método anterior podría aplicarse fácilmente para cribar candidatos a modulador que alteran la unión entre las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb o colágeno, o un fragmento de los mismos.

45 Además de los métodos de resonancia de plasmones superficiales y FRET, la medición de la polarización de fluorescencia es útil para cuantificar la unión. El valor de la polarización de fluorescencia para una molécula fluorescentemente marcada depende del tiempo de correlación rotacional o tasa de rotación. Complejos, tales como aquellos formados por vWF, o fragmento del mismo que se asocian con un polipéptido fluorescentemente marcado (por ejemplo, un polipéptido fluorescentemente marcado representado por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 34, 38 a 45 y 62 a 65), tienen mayores valores de polarización que el polipéptido marcado sin complejar. La inclusión de un candidato a inhibidor de la interacción vWF : polipéptido produce una disminución en la polarización de la fluorescencia, con respecto a una mezcla sin el candidato a inhibidor, si el candidato a inhibidor rompe o inhibe la interacción de vWF, o fragmento del mismo, con dicho polipéptido. La polarización de fluorescencia es muy apta para la identificación de moléculas pequeñas que rompen la formación de complejos de vWF: polipéptido. Una disminución del 10 % o más en la polarización de fluorescencia en muestras que contienen un candidato a modulador, con respecto a la polarización de fluorescencia en una muestra que carece del candidato a modulador, indica que el candidato a modulador inhibe la interacción vWF: polipéptido. Por supuesto, el método anterior podría aplicarse fácilmente para cribar candidatos a modulador que alteran la unión entre las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb o colágeno, o un fragmento de los mismos.

60 Otra alternativa para monitorizar las interacciones vWF : polipéptido usa un ensayo de biosensor. Se han descrito biosensores ICS en la materia (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; Cornell B, Braach-Maksyvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek L, y Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" Nature 1997, 387, 580). En esta tecnología, la asociación de vWF, o fragmento del mismo, y un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido representado por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 34, 38 a 45 y 62 a 65) se acopla al cierre de canales de iones facilitados por gramicidina en bicapas de membrana en suspensión y así a un cambio medible en

la admitancia (similar a la impedancia) del biosensor. Este enfoque es lineal durante seis órdenes de magnitud de cambio de admitancia y es idealmente apto para el cribado de alto rendimiento a gran escala de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Un cambio del 10 % o mayor (aumento o disminución) en la admitancia en una muestra que contiene un candidato a modulador, con respecto a la admitancia de una muestra que carece del candidato a modulador, indica que el candidato a modulador inhibe la interacción de vWF, o fragmento del mismo, y dicho polipéptido. Es importante observar que en ensayos que prueban la interacción de vWF, o fragmento del mismo, con un polipéptido (tal como, por ejemplo, un polipéptido representado por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 34, 38 a 45 y 62 a 65), es posible que un modulador de la interacción no necesite interaccionar necesariamente directamente con el (los) dominio(s) de las proteínas que interaccionan físicamente con dicho polipéptido. También es posible que un modulador interaccione en una localización eliminada del sitio de interacción y produzca, por ejemplo, un cambio conformacional en el vWF. Moduladores (inhibidores o agonistas) que actúan de este modo son, sin embargo, de interés como agentes para modular la agregación mediada por plaquetas. Por supuesto, el método anterior podría aplicarse fácilmente para cribar candidatos a modulador que alteran la unión entre las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb o colágeno, o un fragmento de las mismas.

Cualquiera de los ensayos de unión descritos puede usarse para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que se une a vWF, o fragmento del mismo, o que afecta la unión de, por ejemplo, un polipéptido representado por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 34, 38 a 45 o 62 a 65, a vWF. Para hacer esto, un vWF, o fragmento del mismo, se hace reaccionar con dicho polipéptido en presencia o ausencia de la muestra, y se mide la unión del polipéptido según convenga para el ensayo de unión que se usa. Una disminución del 10 % o más en la unión de dicho polipéptido indica que la muestra contiene un agente que modula la unión de dicho polipéptido a vWF, o fragmento del mismo. Por supuesto, el método anteriormente generalizado podría aplicarse fácilmente para cribar candidatos a modulador que alteran la unión entre las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento y macromoléculas que participan en la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, vWF, gplb o colágeno, o un fragmento de los mismos.

Células

Una célula que es útil según la invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste en células bacterianas tales como, por ejemplo, *E. coli*, células de levadura tales como, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, células de insecto o células de mamífero.

Una célula que es útil según la invención puede ser cualquier célula en la que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una construcción de polipéptido de la invención según la invención pueda introducirse de forma que el polipéptido se exprese a niveles naturales o por encima de los niveles naturales, como se define en el presente documento. Preferentemente, un polipéptido de la invención que se expresa en una célula presenta farmacología normal o casi normal, como se define en el presente documento. Lo más preferentemente, un polipéptido de la invención que se expresa en una célula comprende la secuencia de nucleótidos que puede codificar las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 30 o que pueden codificar una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos presentada en la Tabla 30.

Según una realización preferida de la presente invención, una célula está seleccionada del grupo que consiste en células COS7, una célula CHO, una célula LM (TK), una célula NIH-3T3, célula HEK-293, célula K-562 o una célula de astrocitoma 1321N1, pero también otras líneas celulares transferibles.

En general, "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" significa la cantidad necesaria para lograr el resultado o resultados deseados (tratar o prevenir la agregación de plaquetas). Un experto habitual en la materia reconocerá que la potencia y, por tanto, una "cantidad eficaz" puede variar para los diversos compuestos que inhiben la agregación mediada por plaquetas usados en la invención. Un experto en la materia puede evaluar fácilmente la potencia del compuesto.

Como se usa en el presente documento, el término "compuesto" se refiere a las construcciones de polipéptido desveladas en el presente documento, o a un ácido nucleico que puede codificar dicho polipéptido, o un agente identificado según el método de cribado descrito en el presente documento o dicho polipéptido que comprende uno o más aminoácidos derivatizados.

Por "farmacéuticamente aceptable" se indica un material que no es biológicamente o de otro modo no deseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el compuesto sin causar ningún efecto biológico no deseable o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

La invención desvelada en el presente documento es útil para tratar o prevenir una afección de la agregación mediada por plaquetas en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o composición que inhibe BTK y que inhibe la agregación mediada por plaquetas.

La invención desvelada en el presente documento es útil para tratar o prevenir las primeras etapas de la formación del trombo en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o composición según la invención.

- 5 La invención desvelada en el presente documento es útil para tratar o prevenir reestenosis en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o composición según la invención.

10 Un aspecto de la presente invención es el uso de compuestos de la invención para tratar o prevenir una afección de la agregación mediada por plaquetas en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto en combinación con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

15 Un aspecto de la presente invención es el uso de compuestos de la invención para tratar o prevenir una afección de la agregación mediada por plaquetas en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto en combinación con otro, tal como, por ejemplo, un agente trombolítico.

20 Otro aspecto de la presente invención es un uso de un compuesto de la invención para tratar o prevenir placa o trombo en un individuo. Dicha formación de placas o de trombos puede ser en condiciones de alto cizallamiento. En tanto la trombosis como la reoclusión, la adhesión o anclaje reversible de las plaquetas a alta tasa de cizallamiento va seguida de una firme adhesión mediante el receptor de colágeno sobre plaquetas que producen la activación de plaquetas; el anclaje de plaquetas por vWF a colágeno expuesto en la pared del vaso dañado es especialmente importante en afecciones de alto cizallamiento. Los inventores han encontrado que las construcciones de polipéptido de la presente invención dieron inesperadamente buenos rendimientos bajo altas condiciones de cizallamiento (por ejemplo, Ejemplo 16).

25 La presente invención no se limita a la administración de formulaciones que comprenden un único compuesto de la invención. Está dentro del alcance de la invención proporcionar tratamientos de combinación en los que una formulación se administra a un paciente en necesidad de los mismos que comprende más de un compuesto de la invención.

30 Afecciones de la agregación mediada por plaquetas incluyen, pero no se limitan a, angina inestable, angina estable, angina de pecho, formación de émbolos, trombosis venosa profunda, síndrome urémico hemolítico, anemia hemolítica, insuficiencia renal aguda, complicaciones trombolíticas, púrpura trombocitopénica trombótica, coagulopatía intravascular diseminada, trombosis, cardiopatía coronaria, complicaciones tromboembólicas, infarto de miocardio, reestenosis y formación de trombosis auricular en fibrilación auricular, angina inestable crónica, ataques isquémicos transitorios y accidentes cerebrovasculares, enfermedad vascular periférica, trombosis arterial, preeclampsia, embolia, reestenosis y/o trombosis tras angioplastia, endarterectomía carotídea, anastomosis de injertos vasculares y exposición crónica a dispositivos cardiovasculares. Tales afecciones también pueden resultar de tromboembolia y reoclusión durante y después de terapia trombolítica, después de angioplastia y después de derivación de las arterias coronarias.

40 Es muy conocido en la técnica cómo determinar la inhibición de la agregación mediada por plaquetas usando las pruebas estándar descritas en el presente documento, o usando otras pruebas similares. Preferentemente, el método produciría al menos una reducción del 10 % en la agregación mediada por plaquetas, que incluye, por ejemplo, el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, o cualquier cantidad entremedias, más preferentemente el 90 %.

50 Similarmente, el método produciría al menos una reducción del 10 % en la movilización del calcio intracelular que incluye, por ejemplo, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %. Similarmente, el método produciría al menos una reducción del 10 % en el nivel de PLCg 2 fosforilado que incluye, por ejemplo, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %.

55 La reducción puede medirse, por ejemplo, comparando la impedancia óptica en un agregómetro de plaquetas Chrono-log. También puede usarse cualquier otro método de medición conocido. Por ejemplo, (1) tras la estimulación del colágeno, el nivel de movilización de calcio intracelular inducido por colágeno aumenta con el tiempo y así la medición puede incluir medir el nivel de calcio intracelular inducido por colágeno o (2) tras la estimulación del colágeno, el nivel de PLCg 2 fosforilado aumenta con el tiempo y así la medición puede incluir medir el nivel de PLCg 2 fosforilado.

60 Las células pueden ponerse en contacto *in vitro*, por ejemplo, añadiendo un compuesto de la invención al medio de cultivo (por infusión continua, por administración en bolo, o cambiando el medio a un medio que contiene el compuesto) o añadiendo el compuesto al fluido extracelular *in vivo* (por administración local, administración sistémica, inhalación, inyección intravenosa, administración en bolo o infusión continua). La duración del "contacto" con una célula o población de células se determina por el tiempo que el compuesto está presente a niveles fisiológicamente eficaces o a niveles fisiológicamente eficaces supuestos en el medio o fluido extracelular que baña la célula o células. Preferentemente, la duración del contacto es 1-96 horas, y más preferentemente, durante 24 horas, pero tal tiempo variaría basándose en la semivida del compuesto y podría optimizarse por un experto en la

materia usando experimentación rutinaria.

El compuesto útil en la presente invención puede formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano o un animal doméstico en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida, es decir, por vía oral o parenteralmente, intranasalmente por inhalación, vías intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

El compuesto de la presente invención también puede administrarse usando métodos de administración de terapia génica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.399.346. Usando un método de administración de terapia génica, células primarias transfectadas con el gen para el compuesto de la presente invención pueden transfectarse adicionalmente con promotores específicos de tejido para elegir como diana órganos específicos, tejido, injertos, tumores o células.

Así, el presente compuesto puede administrarse sistémicamente, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Puede encerrarse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, puede comprimirse en comprimidos, o puede incorporarse directamente con la comida de la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos orales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede convenientemente estar entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60 % del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es de forma que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o aromatizante de cereza. Si la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma sólida de dosificación unitaria. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, Shellac o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones de liberación sostenida y dispositivos.

El compuesto activo también puede administrarse intravenosamente o intraperitonealmente por infusión o inyección. Disoluciones del compuesto activo o sus sales pueden prepararse en agua, mezclarse opcionalmente con un tensioactivo no tóxico. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones de almacenamiento y uso ordinarias, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir disoluciones acuosas estériles o dispersiones o polvos estériles que comprenden el principio activo que están adaptadas para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación definitiva debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El excipiente o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, por formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y las técnicas de liofilización, que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional presente en las disoluciones previamente esterilizadas por filtración.

Para administración tópica, el presente compuesto puede aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente se deseará administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

5 Vehículos sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Vehículos líquidos útiles incluyen agua, hidroxialquilos o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en las que el presente compuesto puede disolverse o dispersarse a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse de almohadillas absorbentes, usadas para impregnar vendas y otros apósitos, o pulverizarse sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o de aerosol.

15 También pueden emplearse espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos y ésteres, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con vehículos líquidos para formar pastas fáciles de untar, geles, pomadas, jabones y similares, para aplicación directamente a la piel del usuario.

20 Ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden usarse para administrar el compuesto a la piel son conocidas en la técnica; por ejemplo, véase Jacquet et al. (patente de EE.UU. n° 4.608.392), Geria (patente de EE.UU. n° 4.992.478), Smith et al. (patente de EE.UU. n° 4.559.157) y Wortzman (patente de EE.UU. n° 4.820.508).

25 Pueden determinarse dosificaciones útiles del compuesto comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en modelos animales. Métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones, y otros animales, a seres humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, véase la patente de EE.UU. n° 4.938.949.

30 Generalmente, la concentración del (de los) compuesto(s) en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5-10 % en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será aproximadamente del 0,1-5 % en peso, preferentemente aproximadamente del 0,5-2,5 % en peso.

35 La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, requerida para su uso en el tratamiento variará no solo con la sal particular seleccionada, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que está tratándose y la edad y condición del paciente y será, por último lugar, a criterio del médico adjunto o profesional clínico. La dosificación del compuesto también varía dependiendo de la célula diana, tumor, tejido, injerto u órgano.

40 La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más sub-dosis por día. La propia sub-dosis puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones discretas libremente espaciadas; tal como múltiples inhalaciones de un insufador o por aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

45 Una pauta de administración podría incluir tratamiento diario a largo plazo. Por "largo plazo" se indica al menos dos semanas y preferentemente varias semanas, meses, o años de duración. Pueden determinarse modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación por un experto habitual en la materia usando solo experimentación rutinaria dadas las enseñanzas en el presente documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

50 La invención proporciona un agente que es un modulador de la agregación mediada por plaquetas.

El agente candidato puede ser un agente sintético, o una mezcla de agentes, o puede ser un producto natural (por ejemplo, un extracto de planta o sobrenadante de cultivo). Un agente candidato según la invención incluye una molécula pequeña que puede sintetizarse, un extracto natural, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, etc.

55 Pueden cribarse agentes candidatos a modulador de grandes bibliotecas de agentes sintéticos o naturales. Actualmente se usan numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de agentes basados en sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos. Están comercialmente disponibles bibliotecas de agentes sintéticos de varias compañías que incluyen Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, RU), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH) y Microsource (New Milford, CT). Está disponible una biblioteca de productos químicos raros de Aldrich (Milwaukee, WI). Están disponibles bibliotecas combinatorias y pueden prepararse. Alternativamente, están disponibles bibliotecas de agentes naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales de, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o son fácilmente producibles por métodos muy conocidos en la técnica. Adicionalmente, bibliotecas y agentes naturales y producidos sintéticamente se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

65 Pueden encontrarse agentes útiles dentro de numerosas clases químicas. Agentes útiles pueden ser agentes

orgánicos o agentes orgánicos pequeños. Los agentes orgánicos pequeños tienen un peso molecular superior a 50 aunque inferior a aproximadamente 2.500 daltons, preferentemente inferior a aproximadamente 750, más preferentemente inferior a aproximadamente 350 daltons. Clases a modo de ejemplo incluyen heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides y similares. Los agentes pueden modificarse para potenciar la eficacia, estabilidad, compatibilidad farmacéutica y similares. La identificación estructural de un agente puede usarse para identificar, generar o cribar agentes adicionales. Por ejemplo, si se identifican agentes de péptidos, pueden modificarse en una variedad de formas para potenciar su estabilidad, tal como usando un aminoácido no natural, tal como un D-aminoácido, particularmente D-alanina, funcionalizando el extremo amino o carboxílico, por ejemplo, para el grupo amino, acilación o alquilación, y para el grupo carboxilo, esterificación o amidificación, o similares.

Para el cribado primario, una concentración útil de un agente candidato según la invención es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 μ M o más (es decir, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M, etc.). La concentración de cribado primario se usará como un límite superior, junto con nueve concentraciones adicionales, en las que las concentraciones adicionales se determinan reduciendo la concentración de cribado primario a intervalos semilogarítmicos (por ejemplo, durante 9 concentraciones más) para cribados secundarios o para generar curvas de concentración.

Kit de cribado de alto rendimiento

Un kit de cribado de alto rendimiento según la invención comprende todos los medios necesarios y medios para realizar la detección de un agente que modula la agregación mediada por plaquetas interaccionando con una diana de la invención, tal como, por ejemplo, vWF, o fragmento del mismo en presencia de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido representado por SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 34, 38 a 45, 62 a 65 o una construcción de polipéptido), preferentemente a una concentración en el intervalo de 1 μ M a 1 mM. El kit comprende lo siguiente. Células recombinantes de la invención, que comprenden y que expresan la secuencia de nucleótidos que codifica vWF, o fragmento del mismo, que se cultivan según el kit sobre un soporte sólido, tal como una placa de microtitulación, más preferentemente una placa de microtitulación de 96 pocillos, según métodos muy conocidos para el experto en la materia, especialmente como se describe en el documento WO 00/02045. Alternativamente, vWF, o fragmento del mismo, se suministra en una forma purificada para inmovilizarse sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos por el experto en la materia. Alternativamente, vWF, o fragmento del mismo se suministra en el kit pre-inmovilizado sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos. Alternativamente, en casos en los que la macromolécula va a cribarse contra gplb, gpla/IIa, o colágeno, las realizaciones anteriores llevarían gplb, gpla/IIa, o polipéptido de colágeno o ácido polinucleico respectivamente en lugar de vWF. El kit puede contener más de una macromolécula (por ejemplo, vWF, gplb o macromolécula de colágeno y/o ácido polinucleico). Los agentes moduladores según la invención, a concentraciones de aproximadamente 1 μ M a 1 mM o más, se añaden a pocillos definidos en presencia de una concentración apropiada de construcción de polipéptido, dicha concentración de dicho polipéptido preferentemente en el intervalo de 1 μ M a 1 mM. Los kits pueden contener más de un polipéptido.

Se realizan ensayos de unión según los métodos ya desvelados en el presente documento y los resultados se comparan con el nivel inicial de, por ejemplo, vWF, o fragmento del mismo, que se une a un polipéptido, tal como, por ejemplo, un polipéptido representado por cualquiera de SEC ID N.º: 2 a 15, 20 a 34, 38 a 45 o 62 a 65, pero en ausencia de agente modulador añadido. Los pocillos que muestran al menos 2 veces, preferentemente 5 veces, más preferentemente 10 veces, y lo más preferentemente un aumento o disminución de 100 veces o más en la unión de vWF-polipéptido (por ejemplo) en comparación con el nivel de actividad en ausencia de modulador se seleccionan para análisis adicional.

Otros kits según la invención

La invención proporciona kits útiles para cribar moduladores de la agregación mediada por plaquetas, además de kits útiles para diagnosticar enfermedades o trastornos caracterizados por desregulación de la agregación mediada por plaquetas. Kits útiles según la invención pueden incluir un vWF aislado, o fragmento del mismo. Alternativamente, o además, un kit puede comprender células transformadas para expresar vWF, o fragmento del mismo. En otra realización, un kit según la invención puede comprender un polinucleótido que codifica vWF, o fragmento del mismo. En una realización todavía adicional, un kit según la invención puede comprender los cebadores específicos útiles para la amplificación de vWF, o fragmento del mismo. Alternativamente, en casos en los que la macromolécula que va a cribarse es gplb, o colágeno, las realizaciones anteriores llevarían gplb, gpla/IIa, o polipéptido de colágeno o ácido polinucleico, o fragmento del mismo, respectivamente, en lugar de vWF. El kit puede contener más de una macromolécula (por ejemplo, vWF, gplb, o macromolécula de colágeno o ácido polinucleico, o fragmento del mismo). Kits útiles según la invención pueden comprender un polipéptido aislado representado por cualquiera de SEC ID N.º: 1 a 15, 20 a 47 o 62 a 65, un homólogo del mismo, o una porción funcional del mismo, o una construcción de polipéptido según la invención. Un kit según la invención puede comprender células transformadas para expresar dicho polipéptido. Los kits pueden contener más de un polipéptido. En otra realización, un kit según la invención puede comprender un polinucleótido que codifica una macromolécula, por ejemplo, vWF, gplb, o colágeno, o fragmento del mismo. En una todavía realización adicional, un kit según la invención puede comprender los cebadores específicos útiles para la amplificación de una macromolécula tal como, por ejemplo, vWF gplb, o colágeno, o fragmento del mismo. Todos los kits según la invención comprenderán los

artículos establecidos o combinaciones de artículos y, por tanto, materiales de embalaje. Los kits también incluirán instrucciones para su uso.

Dispositivos médicos

5 La invención también proporciona dispositivos médicos invasivos recubiertos con una construcción de polipéptido de la invención o un agente resultante de un método de cribado de la invención para su uso en dispositivos que requieren los mismos. Ejemplos no limitantes de dispositivos incluyen tubos quirúrgicos, dispositivos de oclusión, dispositivos protéticos. La aplicación para dichos dispositivos incluye procedimientos quirúrgicos que requieren una
10 modulación de la agregación mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión.

Una realización de la presente es un método para tratar dispositivos médicos invasivos para prevenir la agregación
15 mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión que comprende la etapa de recubrir dicho dispositivo con una construcción de polipéptido o agente según la invención.

Otra realización de la presente es un dispositivo médico invasivo que previene la agregación mediada por plaquetas
alrededor del sitio de invasión, en el que dicho dispositivo está recubierto de una construcción de polipéptido o agente según la invención.

20 EJEMPLOS

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos no limitantes.

25 Leyenda de los ejemplos

Ejemplo 1. Inmunización de Llama 002

Ejemplo 2. Clonación del repertorio

Ejemplo 3. Rescate de la biblioteca, preparación de fagos

30 Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con colágeno:

Ejemplo 4. Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con colágeno: Primera y segunda ronda de
inmunopurificación

Ejemplo 5. Caracterización funcional de ligantes de vWF: Inhibición de la unión de vWF a colágeno por VHH

35 **Ejemplo 6.** Expresión y purificación de VHH

Ejemplo 7. ELISA que se une a vWF

Ejemplo 8. Especificidad de los VHH

Ejemplo 9. ELISA de inhibición con VHH purificado

Ejemplo 10. Secuenciación de los clones

40 **Ejemplo 11.** Mapeo de epítopes

Ejemplo 12. Expresión y purificación de VHH bivalentes y biespecíficos

Ejemplo 13. Unión en ELISA a vWF

Ejemplo 14. ELISA de inhibición con VHH purificado

Ejemplo 15. Estabilidad de construcciones bivalentes o biespecíficas en plasma humano

45 **Ejemplo 16.** Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con plaquetas:

Ejemplo 17. Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con plaquetas: Inmunopurificación

50 **Ejemplo 18.** Cribado de la unión al dominio A1 de vWF

Ejemplo 19. Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con plaquetas: MATCHM

Ejemplo 20. ELISA: unión a vWF de VHH purificado

Ejemplo 21. ELISA de inhibición con VHH purificado

Ejemplo 22. Secuenciación de los clones

55 **Ejemplo 23.** Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

Ejemplo 24. Expresión de VHH bivalentes y purificación

Ejemplo 25. Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

Preparación de construcciones biespecíficas para VHH específico de vWF:

60 **Ejemplo 26.** Construcción y secuencia de construcciones biespecíficas

Ejemplo 27. Expresión y purificación de construcciones biespecíficas

Ejemplo 28. Unión a vWF

Ejemplo 29. Inhibición de la unión de vWF a colágeno por las construcciones biespecíficas en comparación con los
VHH monovalentes

65 **Ejemplo 30.** Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

Cribado de ligantes para colágeno tipo I y tipo III:

- Ejemplo 31.** Selección de ligantes para colágeno tipo I
Ejemplo 32. VHH de prueba en ELISA para unirse a colágeno tipo I y tipo III
 5 **Ejemplo 33.** Secuenciación de los clones
Ejemplo 34. Unión de VHH purificado a colágeno tipo I y tipo III
Ejemplo 35. Selección de ligantes para colágeno tipo I que inhibe la interacción con vWF
Ejemplo 36. VHH de prueba en ELISA para unirse a colágeno tipo I y tipo III
Ejemplo 37. Secuenciación de los clones
 10 **Ejemplo 38.** Unión de VHH purificado a colágeno tipo I y tipo III
Ejemplo 39. Prueba de inhibición de la unión de vWF a colágeno por VHH específico de colágeno en ELISA
Ejemplo 40. Inhibición de prueba de la agregación de plaquetas por VHH específico de colágeno a bajo (300 s^{-1}) y a alto (1600 s^{-1}) cizallamiento

15 Semivida mejorada de VHH:

- Ejemplo 41.** Inmunización de llamas
Ejemplo 42. Clonación del repertorio
Ejemplo 43. Rescate de la biblioteca, preparación de fagos
 20 **Ejemplo 44.** ELISA de fagos
Ejemplo 45. Selección: Primera y segunda ronda de bioinmunopurificación
Ejemplo 46. Cribado de clones individuales después de la bioinmunopurificación
Ejemplo 47. Patrón y secuenciación de HinfI
Ejemplo 48. Prueba de reactividad cruzada con albúmina de diferentes especies
 25 **Ejemplo 49.** Expresión y purificación
Ejemplo 50. ELISA en MSA de los nanocuerpos purificados
Ejemplo 51. Construcción y secuencia de construcciones biespecíficas
Ejemplo 52. Expresión y purificación de construcciones biespecíficas
Ejemplo 53. Funcionalidad de ambos VHH en la construcción biespecífica
 30 **Ejemplo 54.** Inhibición de la unión de vWF a colágeno por las construcciones biespecíficas en comparación con los VHH monovalentes

Selección de ligantes para gpIb que inhibe la interacción con vWF:

- 35 **Ejemplo 55.** Selección de ligantes para rgpIb
Ejemplo 56. Cribado de ligantes en ELISA.
Ejemplo 57. Unión de VHH purificado a rgpIb
Ejemplo 58. Secuenciación de los clones
Ejemplo 59. Prueba de propiedades inhibitoras de VHH específicos para gpIb
 40 **Ejemplo 60.** Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

Recubrimiento de endoprótesis vasculares, tubos, globos, catéteres, material de trasplante con VHH:

- 45 **Ejemplo 61.** Estabilidad de VHH
Ejemplo 62. VHH inmovilizados en un polímero

Humanización de C37:

- 50 **Ejemplo 63.** Alineamiento de C37 con DP-47
Ejemplo 64. Mutagénesis de C37

Fragmentos de VHH anti-vWF

- 55 **Ejemplo 65.** Expresión de un fragmento VHH-CDR3 de vWF-C37
Ejemplo 66. Selección mediante la primera y segunda ronda de bioinmunopurificación en A1 recombinante (rA1)
Ejemplo 67. Cribado de clones individuales después de la bioinmunopurificación
Ejemplo 68. Patrón y secuenciación de HinfI
Ejemplo 69. ELISA de inhibición

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunización de llama 002

- 65 Se inmunizó una llama con una mezcla de vWF y colágeno tipo I y tipo III. Aquellos antígenos son todos los que participan en las primeras interacciones que conducen a la agregación de plaquetas (Figura 1). El esquema de inmunización se resume en la Tabla 1

Ejemplo 2: Clonación del repertorio

- Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBL) por centrifugación en un gradiente de densidad (Ficoll-Paque Plus Amersham Biosciences). Los PBL se usaron para extraer ARN total (Chomczynski y Sacchi 1987). Se preparó ADNc en 100 µg de ARN total con MMLV transcriptasa inversa (Gibco BRL) usando oligonucleótidos oligo d(T). El ADNc se purificó con una extracción con fenol/cloroformo, seguido de una precipitación con etanol y posteriormente se usó como molde para amplificar el repertorio de VHH.
- En una primera PCR, el repertorio de segmentos de genes de tanto anticuerpos convencionales (1,6 kb) como de cadenas pesadas (1,3 kb) se amplificaron usando un cebador específico de conductor (5'-GGCTGAGCTCGGTGGTCTGGCT-3') (SEC ID N.º 66) y el cebador oligo d(T) (5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') (SEC ID N.º 67). Los fragmentos de ADN resultantes se separaron por electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de 1,3 kb, que codifica segmentos de anticuerpos de cadenas pesadas, se purificó en gel de agarosa. Se realizó una segunda PCR usando una mezcla de cebadores inversos de FR1 y el mismo cebador directo oligo d(T). Los productos de PCR se digirieron con *SfiI* (introducido en el cebador de FR1) y *BstEII* (que se produce naturalmente en FR4). Tras la electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 400 pares de bases se purificó en gel y se ligó en los sitios de restricción correspondientes del fagémido pAX004 para obtener una biblioteca de VHH clonados después de la electroporación de TG1 de *Escherichia coli*. El tamaño de la biblioteca fue $1,4 \times 10^7$ ufc, y todos los clones contuvieron inserto del tamaño correcto.

Ejemplo 3: Rescate de la biblioteca, preparación de fagos

- La biblioteca se cultivó a 37 °C en 10 ml de medio 2xTY que contenía 2 % de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina, hasta que la DO600 nm alcanzó 0,5. Se añadieron fagos M13KO7 (10^{12}) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 2 x 30 minutos, primero sin agitación, y luego con agitación a 100 rpm. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 4500 rpm a temperatura ambiente. El sedimento bacteriano se resuspendió en 50 ml de medio 2xTY que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina, y se incubó durante la noche a 37 °C con agitación vigorosa a 250 rpm. Los cultivos durante la noche se centrifugaron durante 15 minutos a 10000 rpm a 4 °C. Los fagos se precipitaron con PEG (20 % de polietilenglicol y NaCl 1,5 M) y se centrifugaron durante 30 minutos a 10000 rpm. El sedimento se resuspendió en 20 ml de PBS. Los fagos se precipitaron de nuevo con PEG y se centrifugaron durante 30 minutos a 20000 rpm y 4 °C. El sedimento se disolvió en 5 ml de PBS-1 % de caseína. Los fagos se valoraron por infección de células TG1 a DO600 nm= 0,5 y sembrando sobre placas de LB agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa. El número de transformantes indica el número de fagos (= ufp). Los fagos se almacenaron a -80 °C con 15 % de glicerol.

Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con colágeno (Figura 2)

- Ejemplo 4: Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con colágeno: Primera y segunda ronda de inmunopurificación**

- Se recubrió un pocillo en una placa de microtítulo con 2 µg/ml de vWF o con PBS que contenía 1 % de caseína. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía 1 % de caseína, durante 3 horas a TA. Se añadieron 200 µl de fagos a los pocillos. Después de 2 horas de incubación a TA, los pocillos se lavaron 10x con PBS-Tween y 10x con PBS. Los fagos se eluyeron específicamente con 100 µl de 100 µg/ml de colágeno tipo III. Las eluciones se realizaron durante la noche a temperatura ambiente. Se dejó que los fagos eluidos infectaran células TG1 en crecimiento exponencial, y a continuación se sembraron en placas de LB agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa. Este experimento se repitió durante una segunda ronda de inmunopurificación, bajo las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Los resultados de la inmunopurificación se presentan en la Tabla 2.

Ejemplo 5: Caracterización de ligantes de vWF: Inhibición de la unión de vWF a colágeno por VHH

- Se recubrió durante la noche una placa de microtitulación a 4 °C con colágeno tipo III a 25 µg/ml en PBS. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween y se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente con PBS que contenía 1 % de caseína. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Se mezclaron 100 µl de 2 µg/ml de vWF (el vWF se preincubó a 37 °C durante 15 minutos) con 20 µl de extracto periplásmico que contenía un anticuerpo para VHH (descrito en el Ejemplo 6) y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente en los pocillos de la placa de microtítulo. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Se diluyó un anticuerpo monoclonal anti-vWF-HRP (DAKO) 3.000 veces en PBS y se incubó durante 1 hora. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween y la unión de vWF se detectó con ABTS/H₂O₂. Las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm. Los resultados se presentan en la Tabla 3, que muestran que se obtienen inhibidores después de la primera y segunda ronda de inmunopurificación.

65

Ejemplo 6: Expresión y purificación de VHH

Se preparó plásmido para ligantes para vWF que inhiben la interacción con colágeno tipo III y se transformó en células electrocompetentes WK6. Se usó una única colonia para empezar un cultivo durante la noche en LB que contenía 2 % de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina. Este cultivo durante la noche se diluyó 100 veces en 300 ml de medio TB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, y se incubó a 37 °C hasta que la DO 600 nm = 0,5. Se añadió IPTG 1 mM y el cultivo se incubó durante 3 horas más a 37 °C o durante la noche a 28 °C.

Los cultivos se centrifugaron durante 20 minutos a 10000 rpm a 4 °C. El sedimento se congeló durante la noche o durante 1 hora a -20 °C. A continuación, el sedimento se descongeló a temperatura ambiente durante 40 minutos, se resuspendió en 20 ml de PBS y se agitó sobre hielo durante 1 hora. La fracción periplásmica se aisló por centrifugación durante 20 minutos a 4 °C a 20000 rpm. El sobrenadante que contenía el VHH se cargó sobre Ni-NTA y se purificó a homogeneidad. El rendimiento de VHH se calculó según el coeficiente de extinción. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Ejemplo 7: ELISA: Unión a vWF

Se recubrió una placa de microtitulación con 2 µg/ml de vWF, durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con 300 µl de 1 % de caseína en PBS. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween. Las series de dilución de todas las muestras purificadas se incubaron durante 2 horas a TA. Las placas se lavaron seis veces con PBS-Tween, después de lo cual la unión de VHH se detectó por incubación con mAb de ratón anti-myc 1/2000 en PBS durante 1 hora a TA seguido de conjugado anti-ratón-HRP 1/1000 en PBS, también durante 1 hora a TA. Se realizó tinción con el sustrato ABTS/H₂O₂ y las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm. La unión en función de la concentración de VHH purificado se indica en la Figura 3.

Ejemplo 8: Especificidad de los VHH

Se recubrieron placas de microtítulos con 2 µg/ml de vWF y otros 3 antígenos que no participan en la agregación de plaquetas, pero que también se inmunizaron en llama 002. Se realizó ELISA como se ha descrito en Ejemplo 7 con VHH 670, 67 y 6,7 nM. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Los resultados muestran que el VHH inhibidor es específico para vWF.

Ejemplo 9: ELISA de inhibición con VHH purificado

Se realizó ELISA de inhibición como se ha descrito en el Ejemplo 5, pero con concentraciones decrecientes de VHH y con plasma humano a una dilución de 1/60 en lugar de con vWF purificado o con plasma sin diluir humano. Los resultados se representan en la Figura 4. La concentración de VHH resultante al 50 % de inhibición (CI₅₀) se da en la Tabla 6.

Ejemplo 10: Secuenciación de los clones

Los clones se secuenciaron con cebador inverso universal M13. Las secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 30 (SEC ID números 1, 3, 4, 5, 6 y 7).

Ejemplo 11: Mapeo de epítopesClonación del dominio A3 de vWF en pBAD-Oprl-ss

Se usó el vector pBAD-Oprl-strep-spec para mostrar el dominio A3 de vWF como una fusión con Oprl sobre la superficie de células UT5600 de *E. coli* (F- ara-14 leuB6 azi-6 lacY1 proC14 tsx-67 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi1 DompT fepC266) (Cote-Sierra et al., 1998, Gene, 221: 25-34). El gen que codifica el dominio A3 de vWF (201 aa) se amplificó por PCR usando los cebadores A3for y A3back de PCR.

A3for: CTG GTG CTG CAG AGG TGA AGC TTC GGA GAG GGG CTG CAG ATC (SEC ID N.º 68)

A3back: ATC CAT GCA AAT CCT CTA GAA TCC AGA GCA CAG TTT GTG GAG (SEC ID N.º 69)

El fragmento y vector se digirieron con HindIII y XbaI, se ligaron y se transformaron en UT5600 (= pBAD-vWFA1/pBAD-vWFA3). Las células transformadas se sembraron sobre placas de LB agar que contenían 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina.

El plásmido pBAD-vWFA3 se transformó en células UT5600 F y se sembraron en placas de LB agar con 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina. Se usó una única colonia para inocular medio LB con 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina. Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C a 200 rpm. Al día siguiente, las células se indujeron con 0,2 % de arabinosa y se incubaron durante 1 hora más a 37 °C a 150 rpm. Los lisados celulares totales se hirvieron en tampón de muestra reductor, se cargaron sobre 12 % de SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa para transferencia Western. Las proteínas transferidas se detectaron usando un

anticuerpo monoclonal anti-Opr1 (SH2.2) (Cote-Sierra et al., 1998, Gene, 221: 25-34). Se aplicó un anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma), y las transferencias se desarrollaron con BCIP/NBT (Figura 5). Los plásmidos pBAD-vWF-A3 se transformaron en células UT5600 F y se sembraron sobre placas de LB agar con 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina. Se usó una única colonia para inocular medio LB con 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina. Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C a 200 rpm. Al día siguiente, las células se indujeron con 0,2 % de arabinosa y se incubaron durante 1 hora más a 37 °C a 150 rpm. Se recubrió una placa de microtitulación durante la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal anti-Opr1 (SH2.2) diluido 1/1000 en PBS y se bloqueó durante 2 horas a TA con PBS que contenía 1 % de caseína. Después de la inducción, se dejó que las células totales se unieran a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween. Se dejó que las preparaciones de fagos de colonias individuales se unieran durante dos horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween. Se usó un conjugado de anti-M13 - HRP para la detección de la unión de fago a células de *E. coli* que expresan el dominio A3 o a un antígeno irrelevante sobre su superficie. Las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween. Se realizó tinción con ABTS/H₂O₂ y se midieron señales después de 30 minutos a 405 nm. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Ejemplo 12: VHH bivalentes y biespecíficos: Expresión y purificación

Se diseñó la producción en *E. coli* del vector pAX11 (Figura 6), que permite la clonación de dos etapas de VHH bivalente o biespecífico.

El VHH del extremo carboxi se clona primero con PstI y BstEII, mientras que en la segunda etapa el otro VHH se inserta por SfiI y NotI, que no se cortan dentro del primer fragmento de gen. El procedimiento evita la imposición de nuevos sitios por amplificación y así el riesgo de introducir errores por PCR. La secuencia se muestra en la Tabla 30 (SEC ID números 8, 9, 10, 11 y 12).

Se expresó proteína y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 6. Se necesitó una etapa de purificación adicional sobre Superdex 75 para la eliminación de algo de producto de degradación monovalente (5-10 %). Los rendimientos obtenidos para 1 litro de expresión y purificación de proteína bivalente en *E. coli* se resumen en la Tabla 8.

Ejemplo 13: Unión en ELISA a vWF

Se probó la unión a vWF en ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 7 y en comparación con la unión de VHH monovalente. Los resultados se muestran en la Figura 7. Es evidente de los resultados que VHH bivalente y biespecífico muestran unión más fuerte a vWF cuando se compara con VHH monovalente.

Ejemplo 14: ELISA de inhibición con VHH purificado

Se probó la inhibición de la unión de vWF a colágeno para VHH monovalentes en comparación con bivalentes como se ha descrito en el Ejemplo 5. En lugar de usar vWF purificado, se usó plasma humano, de babuino y de cerdo en paralelo a una dilución de 1/60. Los valores de CI₅₀ se resumen en la Tabla 9.

Ejemplo 15: Estabilidad de construcciones bivalentes o biespecíficas en plasma humano

Se probó la estabilidad de construcciones bivalentes por incubación a 37 °C en plasma humano. Se incubó AM-4-15-3/AM2-75 en plasma humano a una concentración de 38 µg/ml a 37 °C. Se sacó una muestra después de 1, 2, 3, 6 y 24 horas de incubación. Las muestras se diluyeron 10 veces y se analizaron por transferencia Western. Los resultados se resumen en la Figura 8 y muestran que la construcción bivalente es estable durante al menos 24 horas a 37 °C en plasma humano.

Ejemplo 16: Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

Se limpiaron cubreobjetos de vidrio (18 x 18 mm, Menzel Gläser) durante la noche con una disolución de ácido cromosulfúrico (2 % de trióxido de cromo) y se aclararon con agua destilada antes de la pulverización. Se solubilizó colágeno monomérico tipo III en 50 mmol/l de ácido acético y se pulverizó con una densidad de 30 µg/cm² sobre cubreobjetos de vidrio con un cepillo de aire de retoque (modelo 100 de Badger, Badger Brush Co). Después del procedimiento de pulverización, la superficie del colágeno se bloqueó durante 1 hora con 1 % de albúmina humana en PBS (10 mmol/l de tampón fosfato, pH 7,4, y 0,15 mol/l de NaCl) para prevenir la unión de proteína no específica durante la posterior perfusión. Los estudios de perfusión sobre el colágeno tipo III se llevaron a cabo en una cámara de perfusión de placas paralelas pequeñas especialmente ideada con características reológicas bien definidas que acomodan un cubreobjetos de vidrio. Se obtuvo sangre completa por venopunción de voluntarios. La sangre se extrajo a través de la cámara de perfusión por una bomba de infusión Harvard (bomba 22, modelo 2400-004; Harvard, Natick, MA). El tiempo de perfusión fue 5 minutos. Se insertaron cubreobjetos por triplicado en la cámara. Se precalentaron cinco mililitros de sangre completa a 37 °C durante 5 minutos con o sin adición de VHH, y a continuación se recircularon a través de la cámara durante 5 minutos a una tasa de cizallamiento de la pared de

300 s⁻¹ o 1600 s⁻¹. Se sacaron los cubreobjetos, se aclararon, se fijaron con 0,05 % de glutaraldehído, se deshidrataron con metanol y se tiñeron con May-Grünwald/Giemsa. La adhesión de plaquetas se cuantificó con un microscopio óptico (1.000x aumentos) conectado a un analizador de imágenes computerizado (AMS 40-10, Saffron Walden, RU). La adhesión de plaquetas se expresó como el porcentaje de la superficie cubierta con plaquetas. Los resultados se resumen en la Tabla 10 y 11.

Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con plaquetas (Figura 9).

Ejemplo 17: Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con plaquetas: Inmunopurificación

Se recubrieron inmunotubos con 2 µg/ml de vWF o con PBS que contenía 1 % de caseína. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, los tubos se bloquearon con PBS que contenía 1 % de caseína, durante 3 horas a TA. Se añadieron 200 µl de fagos a los inmunotubos con un volumen final de 2 ml en PBS. Después de 2 horas de incubación a TA, los inmunotubos se lavaron 10x con PBS-Tween y 10x con PBS. Los fagos unidos se eluyeron con 2 ml de tampón glicina 0,2 M a pH = 2,4. Las eluciones se realizaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se dejó que los fagos eluidos infectaran células TG1 en crecimiento exponencial, y a continuación se sembraron en placas de LB agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa. Los resultados de la inmunopurificación se presentan en la Tabla 12.

Ejemplo 18: Cribado de la unión al dominio A1 de vWF

Se usó el vector pBAD-OprI-strep-spec para mostrar el dominio A1 de vWF como una fusión con OprI sobre la superficie de células UT5600 de *E. coli* (F- ara-14 leuB6 azi-6 lacY1 proC14 tsx-67 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi1 DompT fepC266) (Cote-Sierra et al., 1998, Gene, 221: 25-34). El gen que codifica el dominio A1 de vWF (219 aa) se amplificó por PCR usando los cebadores A1for y A1back de PCR.

A1for: CCG GTG AGC CCC ACC ACT CTA AGC TTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG (SEC ID N.º 70)
A1back: CCC CAG GGT CGA AAC CCT CTA GAG CCC CGG GCC CAC AGT GAC. (SEC ID N.º 71)

El fragmento y vector se digirieron con HindIII y XbaI, se ligaron y se transformaron en UT5600 (= pBAD-vWFA1/pBAD-vWFA3). Las células transformadas se sembraron sobre placas de LB agar que contenían 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina.

El plásmido pBAD-vWFA1 se transformó en células UT5600 F y se sembraron en placas de LB agar con 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina. Se usó una única colonia para inocular medio LB con 20 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de espectinomicina. Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C a 200 rpm. Al día siguiente, las células se indujeron con 0,2 % de arabinosa y se incubaron durante 1 hora más a 37 °C a 150 rpm. Los lisados celulares totales se hirvieron en tampón de muestra reductor, se cargaron sobre 12 % de SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa para transferencia Western. Las proteínas transferidas se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-OprI (SH2.2) (Cote-Sierra et al., 1998, Gene, 221: 25-34). Se aplicó un anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma), y las transferencias se desarrollaron con BCIP/NBT como se muestra en la Figura 10.

El ELISA se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 11. Los resultados se resumen en la Tabla 13. Los resultados indican que se obtiene VHH específico del dominio A1 de vWF.

Ejemplo 19: Selección de ligantes para vWF que inhiben la interacción con plaquetas: MATCHM

Se usaron células de *E. coli* que expresan el dominio A1 de vWF (Ejemplo 18) para un experimento MATCHM: se cultivaron células UT5600 transformadas con pBAD-OprI-A1 y se indujeron con 0,2 % de arabinosa. Las células se lavaron y se incubaron con los fagos durante 1 hora a TA. Esta mezcla se lavó 7 veces con PBS-Tween y los fagos se eluyeron con células TG1 en crecimiento exponencial. Los presentes inventores realizaron una primera y una segunda ronda de selección. Los resultados se resumen en la Tabla 14.

Ejemplo 20: ELISA: Unión a vWF de VHH purificado

Se expresaron VHH específicos para el dominio A1 de vWF y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 6. La unión en ELISA a vWF se midió como se ha descrito en el Ejemplo 7. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 21: ELISA de inhibición con VHH purificado

Se recubrió una placa de microtitulación durante la noche a 4 °C con un anticuerpo específico para el receptor de plaquetas gplb a 5 µg/ml en PBS. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween y se bloqueó con 300 µl de PBS-1 % de caseína durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween. El receptor de plaquetas gplb (gplb) se aplicó a los pocillos de la placa de microtitulación a una concentración de 1 µg/ml y se dejó que se uniera durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Se añadieron

VHH (A38 (control negativo) y A50 (ligante de A1 de vWF)) a concentración decreciente. El plasma que contiene vWF se pre-incubó a una dilución de 1/128 a 37 °C durante 5 minutos. Se añadió Risto a una concentración final de 760 µg/ml y se añadió al VHH. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se aplicaron 100 µl de esta mezcla a un pocillo de placa de microtitulación y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Se diluyó un anticuerpo monoclonal anti-vWF-HRP 3.000 veces en PBS y se incubó durante 1 hora. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween y la unión de vWF se detectó con ABTS/H₂O₂. Las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm. Los resultados se resumen en la Figura 12.

10 **Ejemplo 22: Secuenciación de los clones**

Se secuenciaron clones con el cebador inverso universal M13. Las secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 30 (SEC ID números 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31).

15 **Ejemplo 23: Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.**

Se realizaron experimentos de cizallamiento como se ha descrito en el Ejemplo 16. La adhesión de plaquetas se expresó como el porcentaje de la superficie cubierta con plaquetas. Los resultados se resumen en la Tabla 15 y 16.

20 **Ejemplo 24: VHH bivalentes: Expresión y purificación**

Se construyeron moléculas bivalentes como se ha descrito en el Ejemplo 12. La secuencia se muestra en la Tabla 30 (SEC ID números 32, 33 y 34).

25 Se expresó proteína y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 6. Se necesitó una etapa de purificación adicional sobre Superdex 75 para la eliminación de algo de producto de degradación monovalente (5-10 %).

Ejemplo 25: Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

30 Se realizaron experimentos de cizallamiento como se ha descrito en el Ejemplo 16. La adhesión de plaquetas se expresó como el porcentaje de la superficie cubierta con plaquetas. Los resultados se resumen en la Tabla 17 y 18.

Preparación de construcciones biespecíficas para VHH específico de vWF (Figura 13)

35 **Ejemplo 26: Construcción y secuencia de construcciones biespecíficas**

Se prepararon construcciones como se ha descrito en el Ejemplo 12, con un VHH específico para vWF y que inhibe la interacción con colágeno, y el segundo VHH también específico para vWF, pero que inhibe la interacción con el receptor de plaquetas gpIb: las secuencias se muestran en la Tabla 30 (SEC ID N.º: 20, 21 y 22)

40

Ejemplo 27: Expresión y purificación de construcciones biespecíficas

Se expresó proteína y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 6. Se necesitó una etapa de purificación adicional sobre Superdex 75 para la eliminación de algo de producto de degradación monovalente (5-10 %). Los rendimientos obtenidos para 1 litro de expresión y purificación de proteína biespecífica en *E. coli* se resumen en la Tabla 19.

45

Ejemplo 28: Unión a vWF

50 Se probó la unión a vWF en ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 7. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Ejemplo 29: Inhibición de la unión de vWF a colágeno por las construcciones biespecíficas en comparación con los VHH monovalentes

55

Se probó la inhibición de la unión de vWF a colágeno para construcciones monovalentes en comparación con biespecíficas como se ha descrito en el Ejemplo 5. Los valores de CI₅₀ se resumen en la Tabla 20.

Ejemplo 30: Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

60

Se realizaron experimentos de cizallamiento como se ha descrito en el Ejemplo 16. La adhesión de plaquetas se expresó como el porcentaje de la superficie cubierta con plaquetas. Los resultados se resumen en la Tabla 21 y 22.

Cribado de ligantes para colágeno tipo I y tipo III (Figura 15)

65

Ejemplo 31: Selección de ligantes para colágeno tipo I

Se recubrió una placa de microtítulo con 25 µg/ml de colágeno tipo I. Se prepararon fagos como se ha descrito en el Ejemplo 3 y se dejó que se unieran al pocillo de una placa de microtítulo que se bloqueó durante 2 horas. Después de lavar, los fagos se eluyeron con tampón glicina 0,1 M a pH = 4,5. Los resultados se resumen en la Tabla 23.

5

Ejemplo 32: VHH de prueba en ELISA para unirse a colágeno tipo I y tipo III

Se probaron clones para la unión en ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 7, pero entonces sobre pocillos recubiertos de colágeno tipo I o tipo III a 25 µg/ml en PBS. Los resultados se resumen en la Tabla 24.

10

Ejemplo 33: Secuenciación de los clones

Los clones se secuenciaron con cebador inverso universal M13. Las secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 30 (SEC ID números 35, 36 y 37).

15

Ejemplo 34: Unión de VHH purificado a colágeno tipo I y tipo III

Se expresaron VHH y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 6. Se recubrió una placa de microtítulo con 25 µg/ml de colágeno tipo I o tipo III y se bloqueó. Se aplicaron ligantes en diluciones dobles y la unión se detectó como se ha descrito en el Ejemplo 7. Los resultados se resumen en la Figura 16.

20

Ejemplo 35: Selección de ligantes para colágeno tipo I que inhibe la interacción con vWF

Se recubrió una placa de microtítulo con 25 µg/ml de colágeno tipo I. Se prepararon fagos como se ha descrito en el Ejemplo 3 y se dejó que se unieran al pocillo de una placa de microtítulo que se bloqueó durante 2 horas. Después de lavar, los fagos se eluyeron con 300 µg/ml de vWF. Se realizaron una segunda y tercera ronda de selección de la misma forma.

25

Ejemplo 36: VHH de prueba en ELISA para unirse a colágeno tipo I y tipo III

Se probaron clones para la unión a colágeno tipo I y tipo III en ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 34.

30

Ejemplo 37: Secuenciación de los clones

Los clones se secuenciaron con cebador inverso universal M13.

35

Ejemplo 38: Unión de VHH purificado a colágeno tipo I y tipo III

Se expresaron VHH y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 6. Se recubrió una placa de microtítulo con 25 µg/ml de colágeno tipo I o tipo III y se bloqueó. Se aplicaron ligantes en diluciones dobles y la unión se detectó como se ha descrito en el Ejemplo 34.

40

Ejemplo 39: Prueba de inhibición de la unión de vWF a colágeno por VHH específico de colágeno en ELISA

Se probó la inhibición como se ha descrito en el Ejemplo 5.

45

Ejemplo 40: Inhibición de prueba de la agregación de plaquetas por VHH específico de colágeno a bajo y a alto cizallamiento

Se realizaron experimentos de cizallamiento como se ha descrito en el Ejemplo 16. La adhesión de plaquetas se expresó como el porcentaje de la superficie cubierta con plaquetas.

50

Semivida mejorada de VHH

Ejemplo 41: Inmunización de llamas

Se inmunizó una llama con seroalbúmina humana (HSA). El esquema de inmunización se resume en la Tabla 25.

55

Ejemplo 42: Clonación del repertorio

La biblioteca se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 2. El tamaño de la biblioteca fue 2×10^7 ufc, y todos los clones contuvieron inserto del tamaño correcto.

60

Ejemplo 43: Rescate de la biblioteca, preparación de fagos

Se prepararon fagos como se ha descrito en el Ejemplo 3.

65

Ejemplo 44: ELISA de fagos

5 Se recubrió una placa de microtitulación (Maxisorp) durante la noche a 4 °C con PBS-1 % de caseína o con 5 µg/ml de HSA (seroalbúmina humana). La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween (0,05 % de Tween20) y se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente con 200 µl de PBS-1 % de caseína. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Se prepararon fagos como se ha descrito anteriormente y se aplicaron a los pocillos en diluciones dobles sucesivas. Las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween. El fago unido se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido 1/2000 en PBS. Las
10 placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween. Se realizó tinción con ABTS/H₂O₂ y las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm. Los resultados se muestran en la Figura 17 e indican la presencia de nanocuerpos específicos de HSA en la biblioteca.

Ejemplo 45: Selección: Primera y segunda ronda de bioinmunopurificación

15 Se recubrió un pocillo en una placa de microtítulo con 10 µg/ml de seroalbúmina de ratón (MSA), o con PBS que contenía 1 % de caseína. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía 1 % de caseína, durante 3 horas a TA. Se añadieron 200 µl de fagos a los pocillos. Después de 2 horas de incubación a TA, los pocillos se lavaron 10x con PBS-Tween y 10x con PBS. Los fagos unidos se eluyeron con
20 100 µl de tampón glicina 0,2 M a pH = 2,4. Se realizaron eluciones durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se dejó que los fagos eluidos infectaran células TG1 de *E. coli* en crecimiento exponencial y a continuación se sembraron en placas de LB agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa. Se realizó una segunda ronda con las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 26.

Ejemplo 46: Cribado de clones individuales después de la bioinmunopurificaciónELISA: Unión a seroalbúmina humana (HSA) y seroalbúmina de ratón (MSA)

25 Se preparó extracto periplásmico como se ha descrito en el Ejemplo 6.
30 Se recubrió una placa de microtitulación con 5 µg/ml de HSA, con 5 µg/ml de seroalbúmina de ratón (MSA) o con PBS-1 % de caseína, durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con 300 µl de 1 % de caseína en PBS. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween. Se preparó fracción periplásmica para 23 clones individuales después de la primera y segunda ronda de selección, y se dejó que se unieran a los pocillos de la placa de microtítulo. Las placas se lavaron seis veces con PBS-Tween, después de lo cual la unión de nanocuerpo se detectó por incubación con anticuerpo monoclonal de ratón anti-histidina Serotec MCA 1396 (dilución 1/1000) en PBS durante 1 hora a TA seguido de conjugado anti-ratón-fosfatasa alcalina 1/2000 en PBS, también durante 1 hora a TA. Se realizó tinción con el sustrato PNPP (p-nitrofenil-fosfato, 2 mg/ml en dietanolamina 1 M, Mg₂SO₄ 1 mM, pH 9,8) y las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm. Los
40 resultados se resumen en la Tabla 27.

Ejemplo 47: Patrón y secuenciación de HinfI

45 Se realizó una PCR en clones positivos después de la segunda ronda de inmunopurificación, con un conjunto de cebadores que se une a una secuencia en el vector. El producto de PCR se digirió con la enzima de restricción HinfI y se cargó sobre un gel de agarosa. Se seleccionaron 4 clones con un patrón de HinfI diferente para evaluación adicional. Aquellos clones se secuenciaron, y los resultados se resumen en la Tabla 30 (SEC ID números 16, 17, 18 y 19).

Ejemplo 48: Prueba de reactividad cruzada con albúmina de diferentes especies

50 Se realizó una SDS-PAGE para plasma (dilución 1/10) de diferentes especies (babuino, cerdo, hámster, ser humano, rata, ratón y conejo) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se prepararon fagos para los clones MSA 21, MSA 24, MSA 210, MSA 212 y un nanocuerpo irrelevante como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se dejó
55 que los fagos se unieran a las albúminas de suero transferidas a nitrocelulosa y se lavaron los fagos sin unir. La unión se detectó con un anticuerpo policlonal anti-M13 acoplado a HRP. Se usó DAP como sustrato para la detección. Los resultados se muestran en la Figura 18.

60 De estos resultados los presentes inventores pueden llegar a la conclusión de que los 4 ligantes son reactivos de forma cruzada entre cerdo, ser humano, ratón (menos para MSA212) y seroalbúmina de hámster. MSA 21 también es reactivo de forma cruzada con seroalbúmina de conejo. Con el nanocuerpo irrelevante no se observó unión (no mostrada).

65 Como experimento de control se realizó una SDS-PAGE con las diferentes muestras de plasma diluidas 1/100 en PBS. El gel se tiñó con Coomassie. Los presentes inventores pueden sacar la conclusión de la Figura 19 que los niveles de albúmina en todas las muestras de plasma son altos, excepto para plasma de conejo, con bajos niveles

de albúmina.

Ejemplo 49: Expresión y purificación

5 Se expresó proteína y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 6.

Ejemplo 50: ELISA en MSA de los nanocuerpos purificados

10 Se recubrió una placa de microtítulo con 5 µg/ml de MSA durante la noche a 4 °C. Después de lavar, la placa se bloqueó durante 2 horas a TA con PBS-1 % de caseína. Las muestras se aplicaron por duplicado empezando a una concentración de 2500 nM a diluciones 1/3 y se dejó que se unieran durante 2 horas a TA. Se añadió un suero policlonal de conejo anti-nanocuerpo a 1/1000 (K208) durante una hora a TA. La detección fue con fosfatasa alcalina anti-conejo conjugada a 1/1000 y tinción con PNPP. Los resultados se muestran en la Figura 20.

15 **Ejemplo 51: Construcción y secuencia de construcciones biespecíficas**

Se prepararon construcciones biespecíficas con el primer VHH específico para albúmina (MSA21) y el segundo VHH específico para vWF (Figura 21). Se prepararon construcciones como se ha descrito en el Ejemplo 12. Las secuencias se muestran en la Tabla 30 (SEC ID números 13,14 y 15)

20 **Ejemplo 52: Expresión y purificación de construcciones biespecíficas**

Se expresó proteína y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 6. Se necesitó una etapa de purificación adicional sobre Superdex 75 para la eliminación de algo de producto de degradación monovalente (5-10 %).

25 **Ejemplo 53: Funcionalidad de ambos VHH en la construcción biespecífica**

30 Se recubrió una placa de microtítulo con 5 µg/ml de seroalbúmina de ratón durante la noche a 4 °C. Después de lavar la placa, los pocillos se bloquearon durante 2 horas con PBS-1 % de caseína. Se dejó que las proteínas biespecíficas se unieran a los pocillos durante 2 horas a TA. Después de lavar, se añadió plasma humano, de perro y de cerdo a diferentes diluciones y se dejó que se unieran durante 2 horas a TA. La unión de vWF se detectó con anti-vWF-HRP de DAKO a dilución 1/3000. Se realizó tinción con ABTS/H₂O₂. Los resultados se muestran en la Figura 22 e indican que la funcionalidad de ambos VHH se retiene en la construcción biespecífica.

35 **Ejemplo 54: Inhibición de la unión de vWF a colágeno por las construcciones biespecíficas en comparación con los VHH monovalentes**

40 Se probó la inhibición de la unión de vWF a colágeno para construcciones monovalentes en comparación con biespecíficas como se ha descrito en el Ejemplo 5. Los valores de CI₅₀ se resumen en la Tabla 28. Los resultados indican que las propiedades inhibitoras de VHH se retienen en la construcción biespecífica.

Selección de ligantes de gpIb que inhiben la interacción con vWF (Figura 23)

45 Se realizaron inmunización, clonación del repertorio y preparación de fagos como se describe en los Ejemplos 1, 2, 3.

Ejemplo 55: Selección de ligantes para rgpIb

50 Se recubrió una placa de microtítulo con un mAAb de ratón contra rgpIb. La placa se bloqueó y se dejó que se uniera rgpIb durante 2 horas a TA a 5 µg/ml. La placa se lavó. Se prepararon fagos como se ha descrito anteriormente y se dejó que se unieran a los pocillos de la placa de microtítulo. Después de lavar, los fagos se eluyeron con tampón glicina 0,1 M a pH = 4,5. Se realizó una segunda ronda de inmunopurificación de la misma forma.

55 **Ejemplo 56: Cribado de ligantes en ELISA.**

Se preparó extracto periplásmico como se ha descrito en el Ejemplo 6.

60 El sobrenadante se aplicó a pocillos recubiertos con mAAb y posteriormente gpIb, como se ha descrito en el Ejemplo 55. Las series de dilución de todas las muestras purificadas se incubaron durante 2 horas a TA. Las placas se lavaron seis veces con PBS-Tween, después de lo cual la unión de VHH se detectó por incubación con mAAb de ratón anti-His-HRP 1/2000 en PBS durante 1 hora a TA seguido de tinción con el sustrato ABTS/H₂O₂. Las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm.

65 **Ejemplo 57: Unión de VHH purificado a rgpIb**

Se preparó fracción periplásmica como se ha descrito en el Ejemplo 6. El sobrenadante que contenía el VHH se

cargó sobre Ni-NTA y se purificó a homogeneidad. El rendimiento de VHH se calculó según el coeficiente de extinción. Se realizó ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 55.

Ejemplo 58: Secuenciación de los clones

5 Los clones se secuenciaron con cebador inverso universal M13.

Ejemplo 59: Prueba de propiedades inhibitoras de VHH específicos para gpIb

10 Se probaron VHH para la inhibición en ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 21.

Ejemplo 60: Evaluación de la inhibición por VHH a alto cizallamiento.

15 Se realizaron experimentos de cizallamiento como se ha descrito en el Ejemplo 16. La adhesión de plaquetas se expresó como el porcentaje de la superficie cubierta con plaquetas.

Recubrimiento de endoprótesis vasculares, tubos, globos, catéteres, material de trasplante con VHH

Ejemplo 61: Estabilidad de VHH

20 Se incubó C37 de VHH a 37 °C y se midió la inhibición de la unión de vWF a colágeno en diferentes momentos de tiempo por ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 7. Los resultados se compararon con VHH guardado a -20 °C y se presentan en la Figura 24. Para la comparación se muestran las actividades de un scFv contra el antígeno B3 (Reiter et al., Protein Engineering, 1994, 7: 697-704), y dicho scFv se modificó por la introducción de un enlace disulfuro entre residuos de la región estructural 44 y 105 para potenciar su estabilidad (dsFv). El dsFv perdió el 40 %
25 de su actividad después de 60 horas incubación a 37 °C. Después de un año de incubación a 37 °C, C37 se analizó para sus propiedades inhibitoras en comparación con C37 guardado en un congelador. El ELISA se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 5 con plasma humano a una dilución final de 1/200. Los resultados se muestran en la Figura 25 e indican que la funcionalidad se retiene completamente (valor de CI_{50} de 0,085 frente a 0,1 µg/ml para C37 guardado a 37 °C frente a -20 °C). Por tanto, se espera que VHH tenga una larga estabilidad en almacén.

Ejemplo 62: VHH inmovilizados en un polímero

35 Se preparó una mezcla de 0,5 ml de 30 % de acrilamida; 1 ml de Tris 1 M a pH = 7,5; 3,5 ml de H₂O; 35 µl de 10 % de APS; 3,5 µl de TEMED. En algunos pocillos se añadió VHH de C37 a una concentración final de 10 µg/ml. Se dejó que la mezcla polimerizara en los pocillos de una placa de 96 pocillos durante 3 horas a TA. Se añadió plasma humano a diferentes diluciones empezando con plasma sin diluir. Después de 1 hora de incubación a TA, la placa se lavó y se añadió anti-vWF-HRP (DAKO) a 1/2000, durante 1 hora a TA. Después de lavar la placa, se añadió sustrato (ABTS/H₂O₂) y se midió la DO 405 nm. El resultado se muestra en la Figura 26. Los resultados indican que
40 el VHH sigue siendo funcional tras la inmovilización en un polímero.

Humanización de C37

Ejemplo 63: Alineamiento de C37 con DP-47

45 El alineamiento del nanocuerpo C37 (SEC ID número 1) y una línea germinal de VH3 humana (DP-47) revelaron un alto grado de homología:

- 50 ◦ Cambios de 4 aa en FR1 en la posición 1, 5, 28 y 30
- Cambios de 4 aa en FR3 en la posición 74, 75, 84 y 94
- Cambios de 3 aa en FR4 en la posición 104, 108 y 111

como se muestra en la Figura 27

Ejemplo 64: Mutagénesis de C37

55 Se mutó C37 usando un método de mutagénesis dirigida al sitio no basado en PCR como se describe por Chen y Ruffner (Chen y Ruffner, Amplification of closed circular DNA in vitro, Nucleic Acids Research, 1998, 1126-1127) y se comercializó por Stratagene (mutagénesis dirigida al sitio Quickchange).

60 Se usó ADN de plásmido como molde en combinación con 2 cebadores mutagénicos (Tabla 29) que introdujeron la(s) mutación (mutaciones) deseada(s). Los 2 cebadores son cada uno complementarios a hebras opuestas del ADN de plásmido del molde. En una reacción de polimerasa usando la ADN polimerasa *Pfu*, cada hebra se extiende desde la secuencia del cebador durante un programa de ciclado usando una cantidad limitada de ciclos. Esto produce una mezcla de hebras naturales y mutadas. La digestión con *DpnI* produce la selección de ADN sintetizado
65 *in vitro* mutado. El ADN se precipitó y se transformó en *E. coli* y se analizó para la mutación requerida por análisis de

secuencias. El clon con la secuencia correcta se llamó C37-hum, la secuencia de aminoácidos está en la Tabla 30 SEC ID número 2.

5 La expresión y purificación de C37-hum se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 6. La inhibición de la unión de vWF a colágeno para C37 se comparó con C37-hum como se ha descrito en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la Figura 28. Muestra claramente que la versión humanizada de C37 sigue siendo completamente funcional.

10 Las posiciones que todavía necesitan ser humanizadas son: Q1, Q5, D104, Q108 y I111. Los presentes inventores pueden humanizar la posición 1 y 5 sin pérdida de inhibición, ya que estos aminoácidos se introdujeron por el cebador de FR1 y no se producen naturalmente en la secuencia de llama. Los presentes inventores también pueden humanizar la posición 111, ya que los presentes inventores aislaron un VHH idéntico a C37, excepto por I111V (AM-2-75 SEC ID número 3) con las mismas características funcionales (Ejemplo 9 y Tabla 6).

15 La posición 108 está expuesta a disolvente en VHH de camélido, mientras que en anticuerpos humanos esta posición está enterrada en la interfase VH-VL (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). En VH aislados, la posición 108 está expuesta a disolvente. La introducción de una Leu hidrófoba apolar en lugar de Gln sin carga polar puede tener un espectacular efecto sobre la capacidad de plegamiento intrínseca/estabilidad de la molécula.

20 **Fragmentos de VHH anti-vWF**

Ejemplo 65: Expresión de un fragmento VHH-CDR3 de vWF-C37

25 Se amplificó la región CDR3 de C37 usando un cebador de sentido directo localizado en la región estructural 4 (directo: **CCCCTGGTCCCAGTCCCTC**) (SEC ID N.º 72) y un cebador de sentido contrario localizado en la región estructural 3 (inverso: **TGTGCTCGCGGGGCCGTAC**) (SEC ID N.º 73).

Con el fin de de clonar el fragmento CDR-3 en pAX10, se realizó una segunda ronda de amplificación por PCR con los siguientes cebadores que introducen los sitios de restricción requeridos:

Cebador inverso Sfi1:

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCTGTGCTCGCGGGGCCGTAC (SEC ID N.º 74)

Cebador directo Not1:

GTCCTCGCAACTGCGGCCGCCCCCTGGTCCCAGTCCCTC (SEC ID N.º 75)

35 Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 50 µl usando 50 pmoles de cada cebador. Las condiciones de reacción para la PCR primaria fueron 11 min a 94 °C, seguido de 30/60/120 s a 94/55/72 °C durante 30 ciclos, y 5 min a 72 °C. Todas las reacciones se realizaron con MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 mM y 1,25 U de ADN polimerasa AmpliTaq God (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica).

40 Después de la escisión con Sfi1 y Not1, el producto de PCR se clonó en pAX10.

Aislamiento de VHH anti-vWF específicos de la conformación

45 **Ejemplo 66: Selección mediante la primera y segunda ronda de bioinmunopurificación en A1 recombinante (rA1)**

50 Se recubrió un pocillo en una placa de microtitulación con 5 µg/ml del dominio A1 recombinante de vWF (rA1), o con PBS que contenía 1 % de caseína. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía 1 % de caseína, durante 3 horas a TA. Se añadieron 200 µl de fagos a los pocillos. Después de 2 horas de incubación a TA, los pocillos se lavaron 10x con PBS-Tween y 10x con PBS. Los fagos unidos se eluyeron con 100 µl de tampón glicina 0,2 M a pH 2,4. Las eluciones se realizaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se dejó que los fagos infectaran células TG1 de *E. coli* en crecimiento exponencial, y a continuación se sembraron en placas de LB agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa. Se realizó una segunda ronda con las mismas condiciones que se han descrito anteriormente, pero los fagos se resuspendieron en 10 µg/ml de vWF. Los pocillos de la placa de microtítulo se lavaron 7 veces durante 30 minutos con 10 µg/ml de vWF. Los resultados se resumen en la Tabla 31.

Ejemplo 67: Cribado de clones individuales después de la bioinmunopurificación

60 **ELISA: Unión a rA1 y vWF**

65 Se usó una única colonia para empezar un cultivo durante la noche en LB que contenía 2 % de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina. Este cultivo durante la noche se diluyó 100 veces en medio TB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, y se incubó a 37 °C hasta DO 600 nm = 0,5. Se añadió IPTG 1 mM y el cultivo se incubó durante 3 horas más a 37 °C o durante la noche a 28 °C. Los cultivos se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. El sedimento se congeló durante la noche o durante 1 hora a -20 °C. A continuación, el sedimento se descongeló a

temperatura ambiente durante 40 minutos, se resuspendió en PBS y se agitó sobre hielo durante 1 hora. Se aisló la fracción periplásmica por centrifugación durante 20 minutos a 4 °C a 20.000 rpm. El sobrenadante que contenía el VHH se usó para el análisis posterior.

- 5 Se recubrió una placa de microtitulación con 2 µg/ml de rA1 o con 1 µg/ml de vWF, durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con 300 µl de 1 % de caseína en PBS. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween. Se preparó fracción periplásmica para 192 clones individuales después de la segunda ronda de selección, y se dejó que se unieran a los pocillos de la placa de microtitulación. Las placas se lavaron seis veces con PBS-Tween, después de lo cual la unión de nanocuerpo se detectó por incubación con anti-nanocuerpo policlonal de conejo (dilución 1/2000) en PBS durante 1 hora a TA seguido de conjugado de cabra anti-conejo-HRP a 1/2000 en PBS, también durante 1 hora a TA. Se realizó tinción con el sustrato ABTS/H₂O₂ y las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm. Los resultados se resumen en la Tabla 32. Los presentes inventores pueden llegar a la conclusión de que 50 clones se unen a rA1 y no a vWF.

15 **Ejemplo 68: Patrón y secuenciación de Hinfl**

- Se realizó una PCR en clones positivos para rA1 y negativos para vWF, después de la segunda ronda de inmunopurificación, con un conjunto de cebadores que se une a una secuencia en el vector. El producto de PCR se digirió con la enzima de restricción Hinfl y se cargó sobre un gel de agarosa. Se seleccionaron 30 clones con un patrón de Hinfl diferente para la evaluación posterior. Aquellos clones se probaron en más detalle por ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 67. De los 30 clones, 4 mostraron claramente que tenían una afinidad mucho mayor por rA1 que por vWF. Los datos se muestran en las Figuras 29 (unión a rA1) y 30 (unión a vWF). Estos clones se secuenciaron, y los resultados se resumen en la Tabla 30 (SEC ID números 62 a 65).

25 **Ejemplo 69: ELISA de inhibición**

- La inhibición por nanocuerpos de la unión de vWF a gplb se determinó por ELISA. Se recubrió una placa de microtitulación durante la noche a 4 °C con un anticuerpo específico para receptor de plaquetas gplb a 5 µg/ml en PBS. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween, y se bloqueó con 300 µl de PBS-1 % de caseína durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween. Se aplicó plasma a los pocillos de la placa de microtitulación a una dilución 1/2 y se dejó que se uniera durante 1,5 horas a 37 °C. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Se añadió VHH a concentración decreciente. El vWF que contenía plasma se pre-incubó a una dilución de 1/50 a 37 °C durante 5 minutos. Se añadió ristocetina a una concentración final de 1 mg/ml y se añadió al VHH. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. Entonces se aplicaron 50 µl de esta mezcla a un pocillo de placa de microtitulación y se incubó durante 90 minutos a 37 °C. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Se diluyó un anticuerpo monoclonal anti-vWF-HRP 3.000 veces en PBS y se incubó durante 1 hora. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween y la unión de vWF se detectó con ABTS/H₂O₂. Las señales se midieron después de 30 minutos a 405 nm.

40 **FIGURAS**

- Figura 1. Interacciones que participan en las primeras etapas de agregación de plaquetas.
 Figura 2. Interacciones que participan en las primeras etapas de agregación de plaquetas. Se indica un VHH que inhibe la interacción entre vWF y colágeno.
 45 Figura 3. Unión a vWF como se ha determinado por ELISA, por VHH purificado como se ha descrito en el Ejemplo 7.
 Figura 4. ELISA para probar la inhibición por VHH de la unión de vWF a colágeno como se ha descrito en el Ejemplo 9.
 Figura 5. Transferencia Western que muestra la expresión del dominio A3 de vWF como una fusión con Opr1 sobre la superficie de *E. coli* como se ha descrito en el Ejemplo 11.
 50 Figura 6. Mapa de restricción del sitio de clonación múltiple de PAX011 para la construcción de nanocuerpos bivalentes o biespecíficos.
 Figura 7. Unión en ELISA a vWF purificado, para VHH monovalente frente a bivalente y biespecífico como se ha descrito en el Ejemplo 13.
 Figura 8. Estabilidad de VHH biespecífico en plasma humano tras la incubación a 37 °C durante hasta 24 horas como se ha descrito en el Ejemplo 15.
 55 Figura 9. Interacciones que participan en las primeras etapas de agregación de plaquetas. Se indica un VHH que inhibe la interacción entre vWF y plaquetas.
 Figura 10. Transferencia Western que muestra la expresión del dominio A1 de vWF como una fusión con Opr1 sobre la superficie de *E. coli* como se ha descrito en el Ejemplo 18.
 60 Figura 11. Unión a vWF como se ha determinado por ELISA, por VHH purificado como se ha descrito en el Ejemplo 20.
 Figura 12. Inhibición de la unión de gplb a vWF por A50 y A38 (control negativo) como se ha descrito en el Ejemplo 21.
 65 Figura 13. Interacciones que participan en las primeras etapas de agregación de plaquetas. Se indica una construcción biespecífica con un VHH específico para vWF y que inhibe la interacción entre vWF y colágeno y el segundo VHH específico para vWF, pero que inhibe la interacción entre vWF y plaquetas.

- Figura 14. Unión en ELISA a vWF como se ha descrito en el Ejemplo 28.
 Figura 15. Interacciones que participan en las primeras etapas de agregación de plaquetas. Se indica un VHH específico para colágeno y que inhibe la interacción entre vWF y colágeno.
 Figura 16. Unión de VHH purificado a colágeno tipo I y tipo III en ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 34.
 5 Figura 17. ELISA de fago para mostrar que los nanocuerpos específicos de HSA están presentes en la biblioteca como se ha descrito en el Ejemplo 44.
 Figura 18. Unión de fagos que expresa los ligantes de albúmina, a plasma transferido sobre nitrocelulosa como se ha descrito en el Ejemplo 48.
 Figura 19. Tinción con Coomassie de muestras de plasma sobre SDS-PAGE como se ha descrito en el Ejemplo 48.
 10 Figura 20. Unión de nanocuerpos purificados a albúmina de ratón como se ha determinado por ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 50.
 Figura 21. Construcciones biespecíficas con un VHH que se une a albúmina y un segundo VHH que se une a vWF para la mejora de la semivida como se ha descrito en el Ejemplo 51.
 Figura 22. ELISA de sándwich que muestra la funcionalidad de ambos VHH en una construcción biespecífica como se ha descrito en el Ejemplo 53.
 15 Figura 23. Interacciones que participan en las primeras etapas de agregación de plaquetas. Se indica un VHH específico para gplb y que inhibe la interacción entre vWF y plaquetas.
 Figura 24. La actividad residual para C37 guardado a -20 °C en comparación con C37 se incubó a 37 °C durante hasta 194 horas. La estabilidad de C37 se compara con la estabilidad de scFv específico para antígeno B3 y una forma estabilizada, dsFv (estabilizado por 2 enlaces disulfuro) como se ha descrito en el Ejemplo 61.
 20 Figura 25. La actividad inhibidora para C37 guardado a -20 °C en comparación con C37 se incubó a 37 °C durante 1 año como se ha descrito en el Ejemplo 61.
 Figura 26. Unión de vWF de plasma humano a C37 inmovilizado en acrilamida como se ha descrito en el Ejemplo 62.
 25 Figura 27. Alineamiento de aminoácidos de C37 con la secuencia de la línea germinal humana DP-47 como se ha descrito en el Ejemplo 63.
 Figura 28. Inhibición de la unión de vWF a colágeno como se ha determinado por ELISA para C37 y C37 hum como se ha descrito en el Ejemplo 64.
 Figura 29. Unión de los clones A11, A12, A13, A14, A15 y A16 a rA1 como se mide en ELISA
 30 Figura 30. Unión de los clones A11, A12, A13, A14, A15 y A16 a vWF como se mide en ELISA

TABLAS

- Tabla 1. Esquema de inmunización usado para la llama 002 según el Ejemplo 1.
 35 Tabla 2. Unidades formadoras de placa (ufp) después de una o dos ronda(s) de inmunopurificación sobre vWF en comparación con PBS-caseína como se ha descrito en el Ejemplo 4. Ufp de vWF (antígeno) divididas entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.
 Tabla 3. Número de inhibidores frente al número de clones probados después de la primera y la segunda ronda de inmunopurificación como se ha descrito en el Ejemplo 5.
 40 Tabla 4. Rendimiento (mg/litro de cultivo) después de la expresión y purificación de VHH cultivado en células WK6 de *E. coli* como se ha descrito en el Ejemplo 6.
 Tabla 5. DO 405 nm para la unión de VHH en ELISA a vWF y 3 antígenos que también se inmunizaron en la llama 002 según el Ejemplo 8.
 45 Tabla 6. Concentración de VHH (nM) necesaria para inhibir la unión de vWF a colágeno al 50 % (Cl₅₀) como se ha descrito en el Ejemplo 9.
 Tabla 7. Mapeo de epítopes de VHH que se une a vWF y que inhibe la interacción con colágeno como se ha descrito en el Ejemplo 11.
 Tabla 8. Rendimiento de proteína purificada (mg) por litro de cultivo para VHH bivalentes y biespecíficos como se ha descrito en el Ejemplo 12.
 50 Tabla 9. Valores de Cl₅₀ para VHH monovalentes en comparación con bivalentes y biespecíficos. Se probó la inhibición con plasma humano, de cerdo y de babuino como se ha descrito en el Ejemplo 14.
 Tabla 10. Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s⁻¹) como se ha descrito en el Ejemplo 16.
 55 Tabla 11. Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s⁻¹) como se ha descrito en el Ejemplo 16.
 Tabla 12. Unidades formadoras de placa (ufp) después de una ronda de inmunopurificación sobre vWF como se ha descrito en el Ejemplo 17. Ufp de vWF (antígeno) divididas entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.
 60 Tabla 13. Resultados del cribado en ELISA de colonias individuales para la unión a vWF y al dominio A1 de vWF como se ha descrito en el Ejemplo 18.
 Tabla 14. Resultados después de una ronda de MATCHM sobre células pBAD-Oprl-A1 como se ha descrito en el Ejemplo 19.
 Tabla 15. Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s⁻¹) como se ha descrito en el Ejemplo 23.
 65 Tabla 16. Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s⁻¹) como se ha descrito en el Ejemplo 23.

Tabla 17. Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 25.

Tabla 18. Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 25.

5 Tabla 19. Rendimiento después de la expresión y purificación de construcciones biespecíficas como se ha descrito en el Ejemplo 27.

Tabla 20. Valores de CI_{50} para nanocuerpos biespecíficos para el dominio A1 y A3 de vWF como se ha descrito en el Ejemplo 29.

10 Tabla 21. Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 30.

Tabla 22. Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 30.

15 Tabla 23. Unidades formadoras de placa (ufp) después de una ronda de inmunopurificación sobre colágeno tipo I como se ha descrito en el Ejemplo 31. Ufp de vWF (antígeno) divididas entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.

Tabla 24. Número de clones que se une a colágeno tipo I y tipo III después de una ronda de selección como se ha descrito en el Ejemplo 32.

Tabla 25. Esquema de inmunización para seroalbúmina humana según el Ejemplo 41.

20 Tabla 26. Resultados después de una y dos rondas de inmunopurificación sobre seroalbúmina de ratón como se ha descrito en el Ejemplo 45.

Tabla 27. Se seleccionaron clones después de una y dos rondas de selección y se prepararon extractos periplásmicos. Estos clones se analizaron en ELISA para unirse a albúmina humana y de ratón como se ha descrito en el Ejemplo 46.

25 Tabla 28. Valores de CI_{50} para nanocuerpos biespecíficos contra la albúmina y contra vWF como se ha descrito en el Ejemplo 54.

Tabla 29. Secuencias de los cebadores usados para la humanización de C37 como se ha descrito en el Ejemplo 64.

Tabla 30. Lista de secuencias de aminoácidos de los péptidos de la presente invención y de factor de von Willebrand (vWF) humano. La secuencia de vWF humano indica los dominios A1 y A3 respectivamente en letras en negrita.

30 Tabla 31. Resultados después de dos rondas de inmunopurificación sobre el dominio rA1 de vWF como se ha descrito en el Ejemplo 66.

Tabla 32. Análisis de ELISA de clones seleccionados para unirse a rA1 y vWF como se ha descrito en el Ejemplo 67.

Tabla 1: Esquema de inmunización usado para la llama 002 según el Ejemplo 1.

Día de inmunización de la llama 002	vWF	Colágeno Tipo I	Colágeno Tipo III
0	100 μg	100 μg	100 μg
7	100 μg	100 μg	100 μg
14	50 μg	50 μg	50 μg
21	50 μg	50 μg	50 μg
28	50 μg	50 μg	50 μg
35	50 μg	50 μg	50 μg

35 **Tabla 2: Unidades formadoras de placa (ufp) después de una o dos ronda(s) de inmunopurificación sobre vWF en comparación con PBS-caseína como se ha descrito en el Ejemplo 4. Pfu vWF (antígeno) dividido entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.**

ronda	Ufp de vWF	Ufp de caseína	Enriquecimiento
Primera	1×10^7	$2,5 \times 10^5$	40
Segunda	5×10^8	$2,5 \times 10^6$	200

40 **Tabla 3: Número de inhibidores frente al número de clones probados después de la primera y la segunda ronda de inmunopurificación como se ha descrito en el Ejemplo 5.**

ronda	Número de inhibidores frente al número de clones probados
Primera	4/800
Segunda	4/96

Tabla 4: Rendimiento (mg/litro de cultivo) después de la expresión y purificación de VHH cultivado en células WK6 de *E. coli* como se ha descrito en el Ejemplo 6.

Nombre de VHH	Rendimiento (mg/litro de cultivo)
22-2L-34	1,4
T76	2,9
AM-4-15-3	2,2
22-4L-16	2,8
C37	3,8
AM-2-75	3,6

Tabla 5: DO 405 nm para la unión de VHH en ELISA a vWF y 3 antígenos que también se inmunizaron en la llama 002 según el Ejemplo 8.

DO405 nm	vWF			Antígeno 1			Antígeno 2			Antígeno 3		
	670	67	6,7	670	67	6,7	670	67	6,7	670	67	6,7
T76	0,77	0,36	0,13	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,04	0,04	0,04	0,03
22-2L-34	1,30	0,63	0,20	0,06	0,0	0,10	0,10	0,07	0,05	0,06	0,05	0,03
22-4L-16	1,41	0,86	0,81	0,08	0,10	0,11	0,15	0,11	0,05	0,08	0,07	0,03
C37	1,51	1,09	1,06	0,10	0,10	0,12	0,12	0,11	0,08	0,10	0,08	0,06
AM-2-75	1,57	1,10	1,04	0,09	0,11	0,12	0,14	0,11	0,09	0,10	0,13	0,05
AM-4-15-3	1,32	1,06	0,56	0,09	0,12	0,12	0,12	0,11	0,10	0,10	0,10	0,08

5 Tabla 6: Concentración de VHH (nM) necesaria para inhibir la unión de vWF a colágeno al 50 % (CI₅₀) como se ha descrito en el Ejemplo 9.

Nombre de VHH	CI ₅₀ (nM) en plasma humano 1/60	CI ₅₀ (nM) en plasma humano sin diluir
22-2L-34	10	-
T76	30	-
AM-4-15-3	7	200
22-4L-16	4	1000
C37	3	-
AM-2-75	2	100

Tabla 7: Mapeo de epítopes de VHH que se une a vWF y que inhibe la interacción con colágeno como se ha descrito en el Ejemplo 11.

Nombre de VHH	Unión a dominio A3 de vWF
22-2L-34	Sí
T76	No
22-4L-16	No
C37	Sí
AM-2-75	Sí

10 Tabla 8: Rendimiento de proteína purificada (mg) por litro de cultivo para VHH bivalentes y biespecíficos como se ha descrito en el Ejemplo 12.

VHH del extremo NH2	VHH del extremo COOH	Rendimiento mg/litro de cultivo
AM-2-75	AM-4-15-3	3,2
AM-4-15-3	AM-4-15-3	2,3
AM-4-15-3	AM-2-75	4,0
AM-2-75	AM-2-75	1,0
AM-2-75	22-4L-16	3,0

Tabla 9: Valores de CI₅₀ para VHH monovalentes en comparación con bivalentes y biespecíficos. La inhibición se probó con plasma humano, de cerdo y de babuino como se ha descrito en el Ejemplo 14.

Primer VHH	Segundo VHH	CI ₅₀ (ng/ml) en plasma humano	CI ₅₀ (ng/ml) en plasma de babuino	CI ₅₀ (ng/ml) en plasma de cerdo
AM-2-T5		150	400	50
AM-4-15-3		50	200	40
22-4L-16		15	70	7
AM-2-75	AM-4-15-3	3	5	6
AM-4-15-3	AM-2-T5	2	8	3
AM-4-15-3	AM-4-15-3	5	10	7
AM-2-75	22-4L-16	8	20	10
AM-2-75	AM-2-75	5		

15 Tabla 10: Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s⁻¹) como se ha descrito en el Ejemplo 16.

	Concentración [µg/ml]	% de inhibición
AM-2-T5	0,2	0
AM-2-75	0,3	12
AM-2-75	0,4	56
AM-2-75	0,6	97
AM-2-75	0,8	96
AM-4-15-3	0,05	0
AM-4-15-3	0,1	75
AM-4-15-3	0,25	74

AM-4-15-3	0,5	86
AM-4-15-3	1	91
22-4L-16	0,1	32
22-4L-16	0,5	54
22-4L-16	0,75	86
22-4L-16	2	97
22-4L-16	10	99
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0,05	0
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0,075	23
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0,1	37
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0,15	56
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0,2	98
AM-4-15-3/AM-4-15-3	1,9	100
AM-4-15-3/AM-2-75	1,9	100
AM-2-75/AM-4-15-3	0,05	2
AM-2-75/AM-4-15-3	0,1	36
AM-2-75/AM-4-15-3	0,2	96
AM-2-75/AM-4-15-3	0,35	91
AM-2-75/AM-4-15-3	0,4	98
AM-2-75/AM-2-T5	0,04	5
AM-2-75/AM-2-75	0,1	26
AM-2-75/AM-2-75	0,2	52
AM-2-75/AM-2-75	0,3	80
AM-2-75/AM-2-75	0,4	99
AM-2-75/AM-2-75	0,83	100
AM-2-75/22-4L-16	1,17	99

Tabla 11: Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 16.

	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	% de inhibición
AM-2-75	10	20
AM-4-15-3	10	17
22-4L-16	10	22
AM-4-15-3/AM-4-15-3	10	23
AM-4-15-3/AM-2-75	10	21
AM-2-75/AM-4-15-3	10	18
AM-2-75/AM-2-75	2	32
AM-2-75/22-4L-16	10	13

- 5 Tabla 12: Unidades formadoras de placa (ufp) después de una ronda de inmunopurificación sobre vWF como se ha descrito en el Ejemplo 17. Ufp de vWF (antígeno) divididas entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.

Ufp de vWF	Ufp de caseína	Enriquecimiento
$1,5 \times 10^7$	1×10^4	1,500

- 10 Tabla 13: Resultados del cribado en ELISA de colonias individuales para unirse a vWF y al dominio A1 de vWF como se ha descrito en el Ejemplo 18.

N.º de clones +vos para vWF / n.º probado	N.º de clones +vos para A1 / n.º probado
344/380	5/570

Tabla 14: Resultados después de una ronda de MATCHM sobre células pBAD-Opr1-A1 como se ha descrito en el Ejemplo 19.

Ronda	N.º de clones +vos para vWF / n.º probado	N.º de clones +vos para A1 / n.º probado
Primera		1/96
segunda	45/348	12/348

Tabla 15: Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 23.

	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	% de inhibición
2A1-4L-129	13,5	26
2A1-4L-129	20	50
2L-A1-15	9,7	30
2L-A1-15	25	45
A50	10,2	20
2A1-4L-T9	11,1	20
2A1-4L-34	11,1	3
Z29	10,6	0
153	9,7	0
M53	10,6	0

5 Tabla 16: Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 23.

	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	% de inhibición
2A1-4L-129	10	0
2L-A1-15	10	3
A50	25	0
2A1-4L-79	25	15

Tabla 17: Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 25.

	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	% de inhibición
2A1-4L-79/2A1-4L-79	25	54
2LA1-15/2LA1-15	25	45

10 Tabla 18: Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 25.

	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	% de inhibición
2A1-4L-79/2A1-4L-79	25	0
2LA1-15/2LA1-15	25	23

Tabla 19: Rendimiento después de la expresión y purificación de construcciones biespecíficas como se ha descrito en el Ejemplo 27.

VHH del extremo NH2	VHH del extremo COOH	Rendimiento mg/litro de cultivo
2A1-4L-79	AM-4-15-3	7,5
2A1-4L-79	AM-2-75	2
2A1-4L-79	22-4L-16	2,5

15 Tabla 20: Valores de CI_{50} para nanocuerpos biespecíficos para el dominio A1 y A3 de vWF como se ha descrito en el Ejemplo 29.

VHH del extremo NH2	VHH del extremo COOH	CI_{50} (ng/ml)
2A1-4L-79	AM-4-15-3	10
AM-4-15-3	-	45
2A1-4L-79	AM-2-75	12
AM-2-75	-	40
2A1-4L-79	22-4L-16	10
22-4L-16	-	10
2A1-4L-79	-	>10000

20 Tabla 21: Inhibición de la agregación de plaquetas a alto cizallamiento (1600 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 30.

	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	% de inhibición
2A1-4L-79/AM-4-15-3	12	100
2A1-4L-79/AM-2-75	0,02	0
2A1-4L-79/AM-2-75	0,1	28
2A1-4L-79/AM-2-75	0,5	79
2A1-4L-79/AM-2-75	1	95
2A1-4L-79/22-4L-16	12	96

Tabla 22: Inhibición de la agregación de plaquetas a bajo cizallamiento (300 s^{-1}) como se ha descrito en el Ejemplo 30.

	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	% de inhibición
2A1-4L-79/AM-4-15-3	10	15
2A1-4L-79/AM-2-75	10	25
2A1-4L-79/22-4L-16	10	27

5 Tabla 23: Unidades formadoras de placa (ufp) después de una ronda de inmunopurificación sobre colágeno tipo I como se ha descrito en el Ejemplo 31. Ufp de vWF (antígeno) divididas entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.

Fagos eluidos de colágeno tipo I	5×10^6
Fagos eluidos de caseína	4×10^4
Enriquecimiento	100

Tabla 24: Número de clones que se une a colágeno tipo I y tipo III después de una ronda de selección como se ha descrito en el Ejemplo 32.

Colágeno Tipo I	15/32
Colágeno Tipo III	7/32
Caseína	0/32

10

Tabla 25: Esquema de inmunización para seroalbúmina humana según el Ejemplo 41.

Día de inmunización	HSA de la llama 006
0	100 μg
7	100 μg
14	50 μg
21	50 μg
28	50 μg
35	50 μg

Tabla 26: Resultados después de una y dos rondas de inmunopurificación sobre seroalbúmina de ratón como se ha descrito en el Ejemplo 45.

	Primera ronda	Segunda ronda
Ufp de seroalbúmina de ratón	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
Ufp de caseína	5×10^3	$2,5 \times 10^3$
Enriquecimiento	5,000	10,000

15 Tabla 27: Se seleccionaron clones después de una y dos rondas de selección y se prepararon extractos periplásmicos. Estos clones se analizaron en ELISA para unirse a albúmina humana y de ratón como se ha descrito en el Ejemplo 46.

	Primera ronda	Segunda ronda
ELISA de seroalbúmina de ratón	1/16	15/16
ELISA de seroalbúmina humana	1/16	15/16
ELISA de caseína	0/16	0/16

20 Tabla 28: Valores de CI50 para nanocuerpos biespecificos contra la albúmina y contra vWF como se ha descrito en el Ejemplo 54.

	CI50 (ng/ml)
AM-2-75	100
MSA21/AM-2-75	60
AM-4-15-3	155
MSA21/AM-4-15-3	245
22-4L-16	100
MSA21/22-4L-16	140

Tabla 29: Secuencias de los cebadores usados para humanización de C37 como se ha descrito en el Ejemplo 64.

Mutación	Molde	Secuencia de cebador
A74S+N75 K+P84A	Natural	5'-AGA GAC AAC TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG-3' (SEC ID N.º 76) Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr (SEC ID N.º 77)
A74S+N75 K+P84A+R 94K	A74S+N75 K+P84A	5'-AT TAC TGT GCT AAA GGG GCC GGT ACT AGT T-3' (SEC ID N.º 78) Tyr Cys Ala Lys Gly Ala Gly Thr Ser (SEC ID N.º 79)
N28T+N30 S A74S+N75 K+P84A+R 94K	A74S+N75 K+P84A+R 94K	5'-TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACT TTC AGT TGG TA-3' (SEC ID N.º 80) Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp (SEC ID N.º 81)

5 Tabla 30: Listado de secuencias de aminoácidos de los péptidos de la presente invención y de factor de von Willebrand (vWF) humano. La secuencia de vWF humano indica los dominios A1 y A3 respectivamente en letras en negrita.

NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
		VHH anti-A3 de vWF
C37	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFN FNWYPMSWVRQAPGK GLEWVSTIS TYGEP RYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQ RGNW DQGTQV TISS
C37-hum	2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTT SWYPMSWVRQAPGK GLEWVSTIS TYGEP RYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK GAGTSSY LPQ RGNW DQGTQV TISS
AM-2-75	3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFN FNWYPMSWVRQAPGK GLEWVSTIS TYGEP RYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQ RGNW DQGTQV TVSS
22-2L-34	4	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLS CAASVRI FTSYAMGWFRQAPGK REFVAAIN RSGKSTYYSDSV EGRFTISRDN AKNTVSLQ MDSLKLEDTAVYYCAADYS GSY TSL WSRPERLDWG OQGTQV TVFS
22-4L-16	5	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRT FSSYAMGWFRQAPGK REFVAAIS WSGGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCVADTGGIS WIR TQGYNYWG OQGTQV TVSS
T76	6	QVQLQESGGGLVQPGESLRLS CAASGSI FSINTMGWYQAPGK QRELVASIT FGGVTNYADSVKGRFTISRDN TNDTVYLQMN SLKPEDTAVYYICNAV TWGGLT NYWGQGTQV TVSS
AM-4-15-3	7	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRL ACAASGSI FSINSMGWYRQAPGK QRELVAHAL ADGSAS YRDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCNTVPSSVTK GYWGQGTQV TVSS
NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
		VHH anti-dominio A3 de vWF: bivalente o biespecífico
AM-4-15- 3/AM-4-15-3	8	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRL ACAASGSI FSINSMGWYRQAPGK QRELVAHAL ADGSAS YRDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCNTVPSSVTK GYWGQGTQV TVSS EPKTPK QAAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSLRLACAASG IFSINSMGWYRQAPGK QRELVAHALADGSAS YRDS VKGRFTISRDN AKNTVY LQMN SLKPEDTAVYYCNTVPSSVTKGYWGQGTQVTVSS
AM-4-15- 3/AM-2-75	9	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRL ACAASGSI FSINSMGWYRQAPGK QRELVAHAL ADGSAS YRDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCNTVPSSVTK GYWGQGTQV TVSS EPKTPK QAAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGF NFWYPMSWVRQAPGK GLEWVSTIS TYGEP RYADSVKADSP SE TPPTRCI CNE OPETEDTAVYYCARGAGTSSYLPQ RGNW DQGTQVTVSS
AM-2- 75/AM-4-15- 3	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFN FNWYPMSWVRQAPGK GLEWVSTIS TYGEP RYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQ RGNW DQGTQV TVSS EPKTPK QAAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSLRLACA ASGSI FSINSMGWYRQAPGKQRELVAHALADGSAS YRDS VKGRFTISRDN AK NTVYLQMN SLKPEDTAVYYCNTVPSSVTKGYWGQGTQVTVSS
AM-2- 75/AM-2-75	11	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFN FNWYPMSWVRQAPGK GLEWVSTIS TYGEP RYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQ RGNW DQGTQV TVSSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNFWYPMS WVRQAPGK GLEWVSTIS TYGEP RYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMN SLRP EDTAVYYCARGAGTSSYLPQ RGNW DQGTQV TVSS

NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
AM-2-75/22-4L-16	12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFNFWYPMWVWRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQRGNWDQGTQVTVSSEPKTPKPPQAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGSTYYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCVADTGGISWIRTQGYNYWGQGTQVTVSS
		VHH anti-vWF + VHH anti-seroalbúmina de ratón
MSA21/ AM-2-75	13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGIS SLGDSLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKPPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFNFW YPMWVWRQAPGKGLEWVSTISYGEPRYADSVKADSPSETPTTRCICNE QPETEDTAVYYCARGAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
MSA21/ AM-4-15-3	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGIS SLGDSLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKPPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFNFW YPMWVWRQAPGKQRELVHAHALADGSASYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNPVPSVTKGYWGQGTQVTVSS
MSA21/ 22-4L-16	15	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGIS SLGDSLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKPPQAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRFTS SYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCVADTGGISWIRTQGYNYWGQGTQVTVSS
		VHH anti-seroalbúmina de ratón
MSA21	16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGIS SLGDSLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSS
MSA24	17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFRNFGMSWVRQAPGKPEWVSSIS GSGSNTIYADSVKDRFTISRDNASTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTQVTVSS
MSA210	18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVAIS SDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMFLQMNLSLRPEDTAVYYCVIGRGS SSQGTQVTVSS
MSA212	19	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSRFGMSWVRQAPGKGLEWVAIS ADGSDKRYADSVKGRFTISRDNKGKMLTLDMNSLRPEDTAVYYCVIGRGS SSQGTQVTVSS
MSAcl6	49	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSSTFSSAAMGWFRQAPGKEREFVGAIK WSGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNVYVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAADRDRYR DRMGPMTTTDFRFWGQGTQVTVSS
MSAcl1 2	50	QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRFTFSSFAMGWFRQAPGREREFVASIG SSGITNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAVNRVYGI YRSGTQYQNWGQGTQVTVSS
MSAcl1 0	51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGLTFNDYAMGWYRQAPGKERDMVATIS IGRRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAVHRQT VVRGPYLLWGQGTQVTVSS
MSAcl1 4	52	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRFTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAGSG RSNSYNYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAASTNLWP RDRNLYAYWGQGTQVTVSS
		NOMBRE SEC ID N.º SECUENCIA
MSAcl1 6	53	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREFVAAIS WSGGTTRYLDSVKGRFTISRDNSTKNAVYVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAVDSSGRL YWTLSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl1 9	54	QVQLVEFPGGLVQAGDSLRLSCEASGRSLGIYKMAWFRQVPGKEREFVAAIS WSGGTTRYIDSVKGRFTISRDNSTKNMYYVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAVDSSGRL YWTLSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl5	55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRFTFSPYTMGWFRQAPGKEREFVAGVT WSGSSTFYGDSVKGRFTASRDSAKNTVTLQMNLSLRPEDTAVYYCAAYGGGL YRDPRESYDYWGRGTQVTVSS
MScl11	56	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGFTLDWPIAWFRQAPGKEREGVSCIR DGTYYADSVKGRFTISRDNANNTVYLQNTLSLRPEDTAVYYCAAPSGPATGS SHTFGIYWNLRDQYDNWGQGTQVTVSS
MSAcl1 5	57	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGFTFDHYTIGWFRQVPGKEREGVSCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAAGGLLR VEELOASDYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl8	58	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTLDYATGWFRQAPGKEREGVACTIS NSDGSTYYGDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCATADRHY SASHHPADFANWGGQGTQVTVSS
MSAcl7	59	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEAYGLTFWRAAMWFRQAPGKERELVVAR WGDGSTRYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAAVR TYGSATYDIWGQGTQVTVSS

NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
MSAcI2 0	60	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLSCTFSGRTFANYAMGWFRQAPGKEREFVAAIN RNGGTTNYADALKGRFTISRDNKNTAFLQMNLSLKPDDTAVVYCAAREWPFSS TIPSGWRYWGQGTQVTVSS
MSAcI4	61	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGPTASSHAIGWFRQAPGKEREFVVGIN RGGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKNVTYVYLQMNRLKPEDSAIYICARPEYSF TAMSKQMDYWGKGLTVTVSS
		VHH anti-dominio A1 de vWF + VHH anti-dominio A3 de vWF
2A1-4L-79/AM-4-15-3	20	QVQLQDSGGRLVKAGASLRSLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVVRGRFTISRDNKNTVYVYLQMMNLKPEDTAVVYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSL RLACAASGSIFINSMGWYRQAPGKQRELVAHALADGSASYRDSVKGRFTISR DNKNTVYVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNTPVSSVTGKYGWQGTQVTVSS
2A1-4L-79/AM-2-75	21	QVQLQDSGGRLVKAGASLRSLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVVRGRFTISRDNKNTVYVYLQMMNLKPEDTAVVYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSL RLSACAASGFNFNWPMSWVRQAPGKLEWVSTISTYGEPRYADSVKADSPSS ETTPTRCICNEQPETEDTAVVYCARAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
2A1-4L-79/22-4 L-16	22	QVQLQDSGGRLVKAGASLRSLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVVRGRFTISRDNKNTVYVYLQMMNLKPEDTAVVYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLVESGGGLVQAGGSL RLSACAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGSTYADSVKGRFTISR DNKNTVYVYLQMNLSLKPEDTAVVYCVADTGGISWIRTQGYNYWGQGTQVTV SS
		VHH anti-dominio A1 de vWF
A50	23	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSACAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAAIS RRGDNVYADSVKGRFAISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAVVYCAAHVTVSA ITLSTSTYDYWGQGTQVTVSS
I53	24	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSACAASGRTKDMAWFRQPPGKEREFVAVIYSSD GSTLVAASVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMTSLKPADTAVVYCATSRGYSGTYY STSRDYWTGGTQVTVSS
Z29	25	QVQLQESGGGSVQAGDSLTLSCAASGRTFSMHAMGWFRQAPGKEREFVAAIS PSAFTEYADSLKGRFTVSRDNKNTVYVYLQMNGLKPEDTAAVYCAARRGAFTA TTAPLYDYWGQGTQVTVSS
M53	26	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCTSGRTFGRRAMAWFRQAPGKERQFVAVIA RYDGLSTLYADSVKGRFTISRDNKNTMYLHMNLTTPEDTAVVYCAAGPRGLY YESRYEYWGQGTQVTVSS
2A1-4L-79	27	QVQLQDSGGRLVKAGASLRSLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVVRGRFTISRDNKNTVYVYLQMMNLKPEDTAVVYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSS
2A1-4L-129	28	QVQLQESGGGLVQAGASLRSLSCAASGRSPSSVPMWFRQAPGKEREFVVFVIG SDHSTLYSTSVRGRFTISRDNKNTVYVYLQMMNLKPEDTAVVYCAARNSAWSS GIYYRETSYDYWGQGTQVTVSS
2A1-4L-34	29	QVQLQDSGGGSVQAGASLRSLSCAASGGTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVGFVIG SDGSTLYSSSVRGRFTISRDNKNTVALQMMNLKPEDTAVVYCAARARYSGI YYRETDYPYWGQGTQVTVSS
2A1-4L-78	30	QVQLQESGGGLVQAGASLRSLSCTASGRSPGGFPMGWFRQAPGKEREFVSGLT RSLFTVYADSVKGRFTVSTDNKNTVYVYLQMNLSLKPEDTAVVYCAARPDLAY SRDPNEYDYWGQGTQVTVSS
2LA1-15	31	QVQLQDSGGGLVQSGGSLRLACAASGRIVSTYAMGWFRQSPGKEREFVATVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVVYCAKTKRTGIPTTARMVDYWGQ GTQVTVSS
		VHH anti-dominio A1 de vWF: VHH biespecífico y bivalente
2A1-4L-79/2A1 -4L-79	32	QVQLQDSGGRLVKAGASLRSLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVVRGRFTISRDNKNTVYVYLQMMNLKPEDTAVVYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGRLVKAGASL RLSACAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIGSDSSTLYTSSVVRGRFTISR DNKNTVYVYLQMMNLKPEDTAVVYCAARSSAFSSGIYYREGSYAYWGQGTQV TVSS
2LA1-15/2LA 1-15	33	QVQLQDSGGGLVQSGGSLRLACAASGRIVSTYAMGWFRQSPGKEREFVATVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVVYCAKTKRTGIPTTARMVDYWGQ GTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQSGGSLRLACAASGRIVSTYA MGWFRQSPGKEREFVATVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVVYCAK TKRTGIPTTARMVDYWGQGTQVTVSS
A50/A5 0	34	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSACAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAAIS RRGDNVYADSVKGRFAISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAVVYCAAHVTVSA ITLSTSTYDYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQAGGSLR LSACAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAAISRDNVYADSVKGRFAISR DNAESTLYLQMNLSLKPEDTAVVYCAAHVTVSAITLSTSTYDYWGQGTQVTV SS
		VHH anti-colágeno

NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
3P1-31	35	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRFRYAMGWYRQAPGKQRELVAAIT SGGRTSVADTVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSLKPEDAAYVYCTLYNSTTNY YNQSPSSWGQGTQVTVSS
3L-41	36	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRFRYAMGWYRQAPGKQRELVAAIT SNGRPSVADSVKGRFTISSDTAKNTVYLQMNLSLKPEDTALYYCTLYNTSADY YNQSPSSWGQGTQVTVLS
3P2-31	37	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTTMGWFRQAPGKERQFVAALTWIG GSPVYADSVKGRFTTWRVLDNNTVYLHMNSLKPEDTAVYHCAAARTYYGNIS EYYDYWGQGTQVTVSS
		VHH anti-vWF: humanizado
C37-3	38	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNPNWYPMWVRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGAGTSSY LPQRGNWDQGTQVTVSS
C37-4	39	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNPNWYPMWVRQAPGKGLEWVSTIE TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKAGAGTSSY LPQRGNWDQGTQVTVSS
C37-8	40	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMWVRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKAGAGTSSY LPQRGNWDQGTQVTVSS
C37-10	41	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMWVRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKAGAGTSSY LPQRGNWDQGTQVTVSS
		VHH humanizado anti-vWF + VHH anti-seroalbúmina de ratón
MSA21/ C37-hum	42	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVIEWSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNP GGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SWYPMWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
MSA24/ C37-hum	43	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKPEWVSSIS GSGSNTIYADSVKDRFTISRDNKSTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SWYPMWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
MSA210 / C37-hum	44	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAIS SDSGTKNYADSVKGRFTISRDNKMLFLQMNLSLKPEDTAVYYCVIGRGS SQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS WYPMWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
MSA212 / C37-hum	45	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAIS ADGSDKRYADSVKGRFTISRDNKMKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGS SQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS WYPMWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
		VHH anti-colágeno: biespecífico
3P1-31/3P2 -31	46	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRFRYAMGWYRQAPGKQRELVAAIT SGGRTSVADTVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSLKPEDAAYVYCTLYNSTTNY YNQSPSSWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAASGRFTTMGWFRQAPGKERQFVAALTWIGGSPVYADSVKGRFTTWRVLDNN TVYLHMNSLKPEDTAVYHCAAARTYYGNISEYYDYWGQGTQVTVSS
3L-41/3P2 - 31	47	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRFRYAMGWYRQAPGKQRELVAAIT SNGRPSVADSVKGRFTISSDTAKNTVYLQMNLSLKPEDTALYYCTLYNTSADY YNQSPSSWGQGTQVTVLSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAASGRFTTMGWFRQAPGKERQFVAALTWIGGSPVYADSVKGRFTTWRVLDNN TVYLHMNSLKPEDTAVYHCAAARTYYGNISEYYDYWGQGTQVTVSS
		VHH anti-vWF específico de conformación
A11	62	EVQLVESGGRLVKAGASLRLSCAASGRFTFSLPMAWFRQAPGKEREFVAFVIG SDSSTLYTSSVGRFTISRDNKNTVYLQMMNLKPEDTAVYYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSS
A12	63	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRFTFSTYALGWFRQVPGKREFIAVIY WRDGSSTLYSDSVKGRFTISKDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCANRHDSRG TYSSRGYDYWGQGTQVTVSS
A13	64	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTKDMAWFRQPPGKEREFVAVIYSSD GSTLVAASVGRFTISRDNKNTVYLQMTSLKPADTAVYYCATSRGYSGTYY STSRDYWGQGTQVTVSS

NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
A15	65	QVQLVESGGLVQAGGSLRLSCAASGRITKDMAWFRQPPGKEREFAVAVIYSSD GSTLVAASVTGRFTI SRDNAKNMVLQMTSLKPADTAVVYCASSRGYSGTY STSRDYDWGQGTQVTVSS
NOMBRE	SEC ID N.º	SECUENCIA
		vWF humano
vWF humano	48	MIPARFAGVLLALALLPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDVNTFDGSMYS FAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVLGEFEDIHLFVNGTVTQ GDQRVSMFYASKGLYLETEAGYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFN KTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWALCERASPPSS SCNISSGEMQKGLWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGG LECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSAACSPVCPAGMEYRQCVSFCARTC QSLHINEMCQERCVDGCSCEGQLLEDEGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLS RDCNTICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHKSFDRNYFTFSGICQYLLAR DCQDHSFSIVIEVQCADDRDAVCTRSVTVRLPGLHNSLVKLKHGAGVAMDG QDIQLPLLKGLDRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRRLLVKLSFVYAGKT CGLCGNYNGNQDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQDLQKQHSDFCAL NPRMTRFSEEAVALTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCRVYDVCSCSDGRCPFHQ ALASYAAACAGRVVAVREPRGRCBLNCPKGGVYLQCGTPCNLTCRSLSYPD ECCNEACLEGCFPCPGLYMDEGDCVPAKQCCPYDGEI FQPEDIFSDHHTM CYCEDGFMHCTMSGVPGLLFDVAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADN LRAEGLETKTKQNYDLECMGCGVSGCLCPGMVRHNRVRCVACERCPCHQ GKEYAPGETVKIGCNTVCRDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYL FPGECCQVVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSPVSKCKKRVITLVBGGEIEL FDGEVNVKRPMDETHFEVVESEGRYI ILLLGKALSVDWRHLSISVVLKQTY QEKVCGLCGNFDG IQNNDLTSSNLQVEEDPVDGNSWKVSSQCADTRKVLPLD SSPATCHNIMKQTMVDSSCRILTSDVFDQCNKLVDPPEYLDVCIYDTCSE SIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGKVVWTRTATLCPQSCBERNLRENGYCEW RYNSCAPACQVTCQHPELACPVQCVGCHACHCPPGKILDELLQTCVDPEDC PVCEVAGRRFASGKVKTLNPSDPEHCQICHCDVNLTCBACQEPFGLVVPPT DAPVSPPTLYVEEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAFIYDTCSE VDMMERLRISQKWRVAVVEYHDGSHAYI GLKDRKRPSELRRIASQVKYAGS QVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRIALLMASQEPQMRNRFVRYVQGL KKKVIIVIPVIGPHANLQIRLIEKQAPENKAPVLSVSSVDELEQRDEIVSY LCDLAPAEAPPPTLPPHMAQVTVGGLRNSMVLDAFVLEGSCKIYDTCSE KEFMEVVIQRMVDGQDSIHVTVLQYSYMTVEYPFSEASQSGDILQVRREIR YQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNLVYVMTGNPASDEIKRLPG DIQVVPICVCPNANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPDLVLRQCCSGE GLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGP RLTQVSVLQYGSITITIDVPWNVPEKAHLLSLVDMQREGGSPQIGDALGFA VRYLTSEMHGARPAGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAARSNRVTFPIGTGD RYDAAQLRILAGPAGDSNVKLRITEDLPTMVTLGNSPLHKLCSGFVRI CMD EDGNEKRPDGVWTLFDQCHVTTCQPDGQTLKSHRVNCDRGLRSPCNSQSP VKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDQGNFKLTGSCSYLVLFQNKQDLE VILHNGACSPGARQGMKSEIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSVPYVGGN MEVNVYGAIMHEVRFNHLGHIFFTFPQNNFQLQLSPKTFASKTYGLCGICD ENGANDFMLRDGTVTDDWKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVDPSSHCQV LLLPLFAECHKVLAPATFYAICQQDSCHQEQVCEVIASYAHLCRTNGVCVDW RTPDFCAMSPPSLVYNHCEHGCRPHCDGNVSSCGDHPSEGCFCPPDKVMLE GSCVPEEACTQICIGEDGVQHGFLEAWVPDHQPCQICTLSGRKVNCTTQPCP TAKAPTCGLCEVARLRQADQCCPEYECVCDPVSCDLPPVPHCERGLQPTLT NPGECRPNFTCACRKEECKRVSPSPCPPHRLPTLRKTKCCDEYECACNCVNS TVSCLPGLYLASTATNDGCGTTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGGQWEEGCDVCTC TDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSRGFTYVLHEGECGRCLPSACEVVTGS PRGDSQSWSKSVGSQWASPENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSCPQLEVPVC PSGFQLSCKTSACCPSCRERMEACMLNGTVIGPGKTVMDVCTTCRCMVQV GVI SGFKLECRKTTNCPPLGYKEENNTGECGRCLPTACTIQLRGGQIMTL KRDETLQDGCDFHCKVNERGEYFWEKRVTCGPPFDEHKCLAEGGKIMKIPG TCCDTCEPEPCNDITARLQYVKGSCCKSEVEVDIHYCQKCKASKMYSIDIN DVQDQCSCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK

Tabla 31: Resultados después de dos rondas de inmunopurificación sobre el dominio rA1 de vWF como se ha descrito en el Ejemplo 66

	Primera biblioteca	Segunda biblioteca	Tercera biblioteca
Ufp de rA1	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁷	4 x 10 ⁹
Ufp de caseína	2 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴
Enriquecimiento	5,000	1,000	200,000

5 Tabla 32: Análisis de ELISA de clones seleccionados para unirse a rA1 y vWF como se ha descrito en el Ejemplo 67

	Primera biblioteca	Segunda biblioteca	Tercera biblioteca
ELISA de rA1	54/64	51/64	49/64

ES 2 542 330 T3

ELISA de vWF	36/64	35/64	33/64
--------------	-------	-------	-------

REIVINDICACIONES

- 1.- Una construcción de polipéptido que consiste en uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos contra el factor de von Willebrand (vWF) y opcionalmente un conector peptídico, en la que el anticuerpo o anticuerpos de dominio único está/n seleccionado/s del grupo de anticuerpos de dominio único que consiste en las secuencias representadas por cualquiera de SEC ID N.º: 3, 5 o 7, o una secuencia homóloga de cualquiera de SEC ID N.º: 3, 5 o 7, con una identidad de secuencias superior al 70 % con la secuencia parental; y en la que dicha secuencia homóloga puede inhibir al menos el 50 % de agregación de plaquetas a una tasa de cizallamiento de 1600 s⁻¹ a una concentración entre 0,08 y 0,3 µg/ml.
- 2.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 1, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por SEC ID N.º: 3, o con una secuencia homóloga de SEC ID N.º: 3 con una identidad de secuencias superior al 70 % con la secuencia parental.
- 3.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 1, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por SEC ID N.º: 5, o con una secuencia homóloga de SEC ID N.º: 5 con una identidad de secuencias superior al 70 % con la secuencia parental.
- 4.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 1, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por SEC ID N.º: 7, o con una secuencia homóloga de SEC ID N.º: 7 con una identidad de secuencias superior al 70 % con la secuencia parental.
- 5.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 1, en la que la construcción de polipéptido consiste en dos anticuerpos de dominio único dirigidos contra el factor de von Willebrand; y
- i. en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por SEC ID N.º: 3 o con una secuencia homóloga de SEC ID N.º: 3 con una identidad de secuencias superior al 70 %, o
 - ii. en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por SEC ID N.º: 5, o con una secuencia homóloga de SEC ID N.º: 5 con una identidad de secuencias superior al 70 %, o
 - iii. en la que al menos un anticuerpo de dominio único se corresponde con una secuencia representada por SEC ID N.º: 7, o con una secuencia homóloga de SEC ID N.º: 7 con una identidad de secuencias superior al 70 %.
- 6.- Construcción de polipéptido, que comprende la construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además al menos un anticuerpo de dominio único dirigido contra la seroalbúmina, en la que el al menos un anticuerpo de dominio único dirigido contra la seroalbúmina se corresponde con una secuencia representada por cualquiera de SEC ID N.º: 16 a 19 o con una secuencia homóloga de cualquiera de SEC ID N.º: 16 a 19 con una identidad de secuencias superior al 70 % con la secuencia parental.
- 7.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 6 correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEC ID: 13 a 15.
- 8.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 7, en la que al menos un anticuerpo de dominio único es un dominio VHH.
- 9.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 8, en la que al menos un anticuerpo de dominio único es un dominio VHH que se obtiene inmunizando un camello y obteniendo hibridoma del mismo, o clonando una biblioteca de anticuerpos de dominio único y posteriormente seleccionando el VHH usando expresión en fago.
- 10.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 9, en la que al menos un anticuerpo de dominio único está humanizado
- 11.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos un anticuerpo de dominio único es un dominio VHH humanizado.
- 12.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 11, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se humaniza reemplazando uno o más de los aminoácidos de *Camelidae* con sus homólogos humanos como se encuentra en una secuencia consenso humana.
- 13.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 11 o 12, en la que al menos un anticuerpo de dominio único se humaniza reemplazando cualquiera de los siguientes residuos tanto solos como en combinación: posiciones FR1 1, 5, 28 y 30, los aminoácidos distintivos en las posiciones FR2 37, 44, 45 y 47, posiciones FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94 y 4 103, 104, 108 y 111, en la que la numeración de las posiciones es según la numeración de Kabat.

- 14.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 13, en la que el conector peptídico opcional consiste en tres residuos de alanina.
- 5 15.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 13, en la que el extremo C del primer anticuerpo de dominio único está ligado al extremo N del siguiente anticuerpo de dominio único.
- 16.- La construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 15, en la que dicha secuencia homóloga no puede inhibir el 50 % de agregación de plaquetas a una tasa de cizallamiento de 300 s^{-1} a $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ o a concentraciones menores.
- 10 17.- Una composición que comprende una construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 18.- La composición que comprende una construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 16 adaptada a la vía de administración elegida, en la que la vía de administración es oral o parenteral, intranasal por inhalación, intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 19.- Una composición que comprende una construcción de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 16 y al menos un agente trombolítico, para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.
- 20.- La composición según la reivindicación 19, en la que dicho agente trombolítico es cualquiera de estafilocinasa, activador tisular del plasminógeno, estreptocinasa, estreptocinasa monocatenaria, urocinasa y complejo acilado de 25 plasminógeno-estreptocinasa.
- 21.- Un ácido nucleico que codifica una construcción de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 22.- Una construcción de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento, 30 prevención y/o alivio de trastornos relacionados con la agregación mediada por plaquetas o disfunción de la misma.
- 23.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 22, en la que dichos trastornos son cualquiera que surja de angina inestable, angina estable, angina de pecho, formación de émbolos, trombosis venosa profunda, síndrome urémico hemolítico, anemia hemolítica, insuficiencia renal aguda, complicaciones trombolíticas, púrpura trombocitopénica trombótica, coagulopatía intravascular diseminada, trombosis, cardiopatía coronaria, 35 complicaciones tromboembólicas, infarto de miocardio, reestenosis y formación de trombosis auricular en fibrilación auricular, angina inestable crónica, ataques isquémicos transitorios y accidentes cerebrovasculares, enfermedad vascular periférica, trombosis arterial, preeclampsia, embolia, reestenosis y/o trombosis tras angioplastia, endarterectomía carotídea, anastomosis de injertos vasculares y exposición crónica a dispositivos cardiovasculares.
- 40 24.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 22, en la que dichos trastornos son cualquiera que surja de ataque isquémico cerebral transitorio, angina inestable o estable, angina de pecho, infarto cerebral, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis, injerto de derivación coronaria, o valvuloplastia de la 45 arteria coronaria e intervenciones coronarias tales como angioplastia, implantación de endoprótesis vascular, endarterectomía carotídea o aterectomía.
- 25.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 22, en la que dichos trastornos son cualquiera de formación de un trombo no oclusivo, formación de un trombo oclusivo, formación de trombo arterial, oclusión 50 coronaria aguda, reestenosis, reestenosis después de PCTA o implantación de endoprótesis vascular, formación de trombo en arterias estenosadas, hiperplasia después de angioplastia, aterectomía o implantación de endoprótesis arterial, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de las arterias enfermas.
- 26.- La construcción de polipéptido según la reivindicación 22, en la que dichos trastornos son trastornos que se producen por la formación de placas o de trombos en entornos de alto cizallamiento.
- 55 27.- Un método de producción de una construcción de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende
- (a) cultivar células huésped que comprenden ácido nucleico que puede codificar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en condiciones que permitan la expresión del polipéptido, y, 60 (b) recuperar el polipéptido producido del cultivo.
- 28.- Un método según la reivindicación 27, en el que dichas células huésped son bacterianas o levadura.
- 29.- Un método para tratar dispositivos médicos invasivos para prevenir la agregación mediada por plaquetas 65 alrededor del sitio de invasión que comprende la etapa de recubrir dicho dispositivo con una construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 16.

30.- Un método de diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por disfunción de la agregación mediada por plaquetas que comprende las etapas de:

- 5 (a) poner en contacto una muestra con una construcción de polipéptido según las reivindicaciones 1 a 16, y
(b) detectar la unión de dicha construcción de polipéptido a dicha muestra, y
(c) comparar la unión detectada en la etapa (b) con un patrón, en la que una diferencia en la unión con
10 respecto a dicha muestra es diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por disfunción de la agregación mediada por plaquetas.

Figura 1

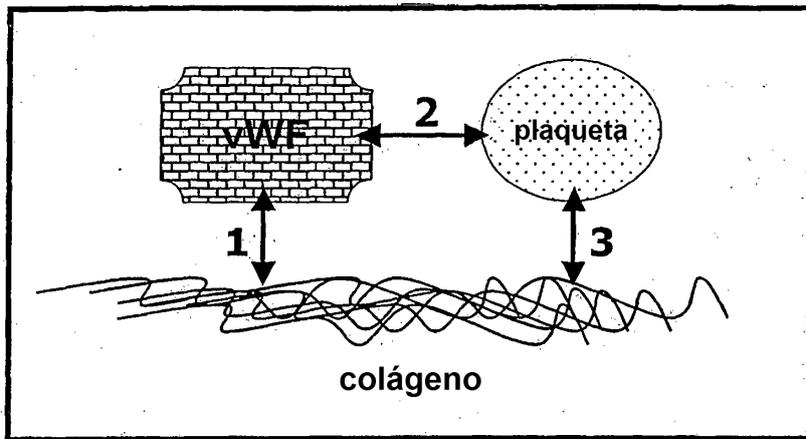


Figura 2

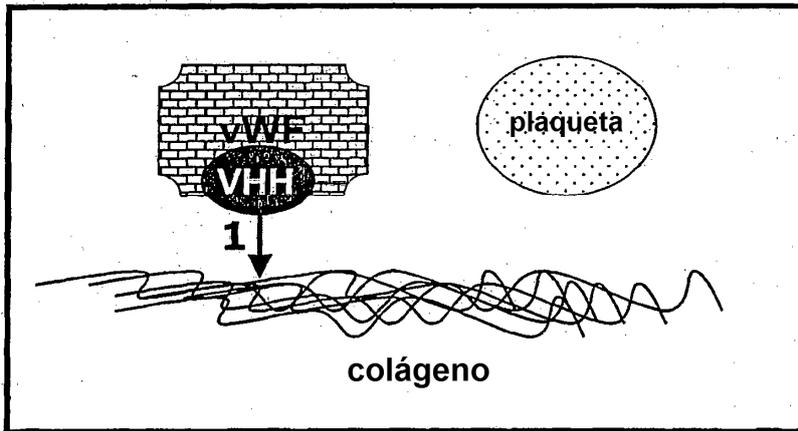


Figura 3

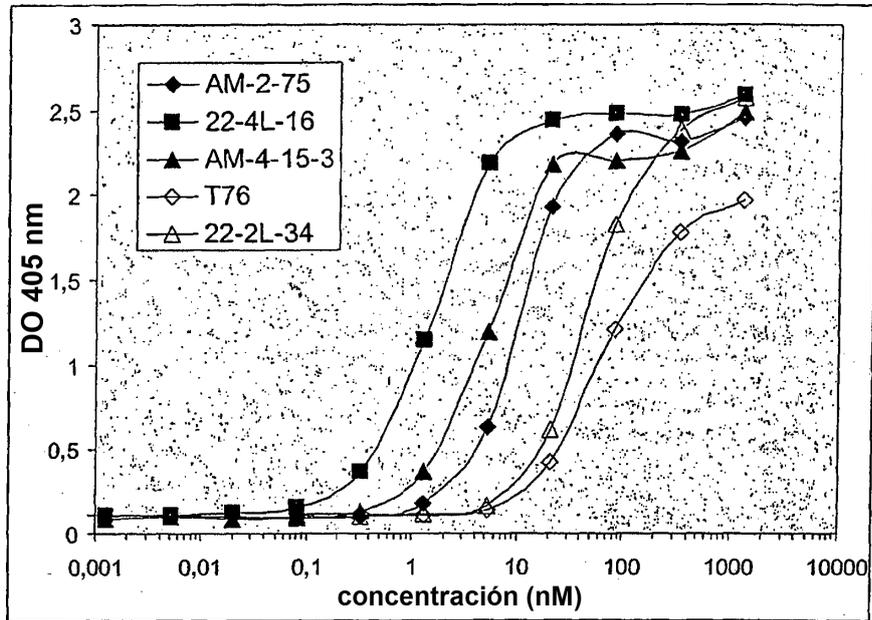


Figura 4

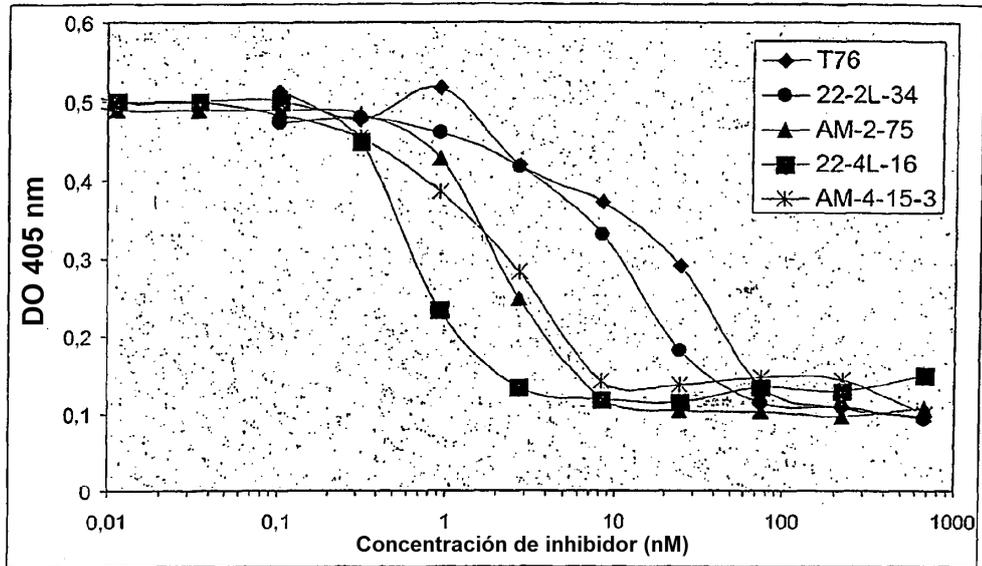


Figura 5



figura 6

```

HindIII
1 aagcttgcat gcaaattcta ttccaaggag acagtcataa tgaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgctatt
                                     M K Y L L P T A A A G L L L
                                     <
                                     pelB-conductor

      SfiI  NcoI          NotI          PstI
81 actcggggc cagccggcca tggggcctaa taggcccggc cacaggtgca gctgcaggag tcataatgag ggacccaggt
   L A A Q P A M G P - - A A A Q V Q L Q E S - - G T Q V
   Conductor          ><  VHH#1 >          <          VHH#2

BetEII
161 caccgtctcc tcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgcacatca tcatcatcat cattaatgag
    T V S S E Q K L I S E E D L N G A A H H H H H H (SEC ID Nº 83)
    ><          C-MYC          >          <          His6          >

EcoRI
241 aattcaactgg ccg (SEC ID Nº 82)
    
```

Figura 7

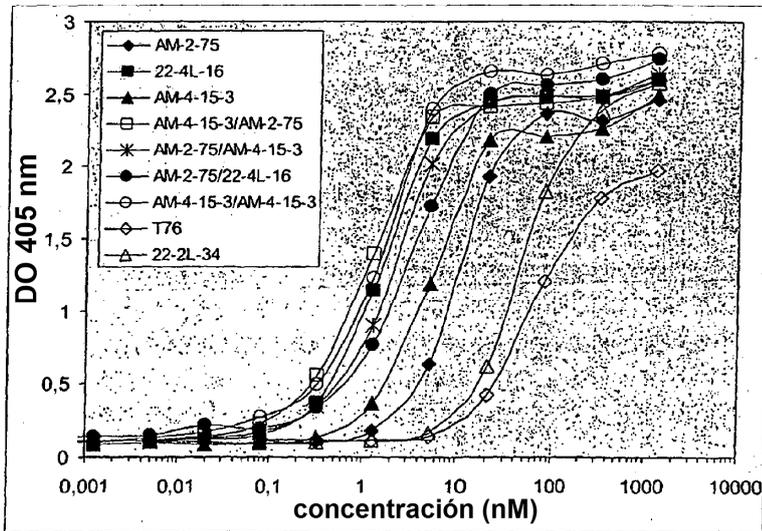


Figura 8

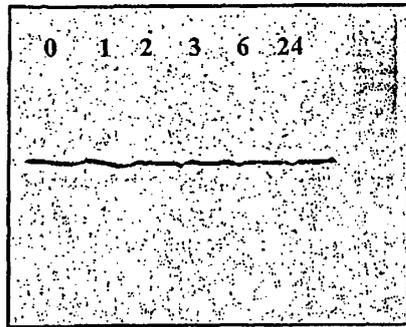


Figura 9

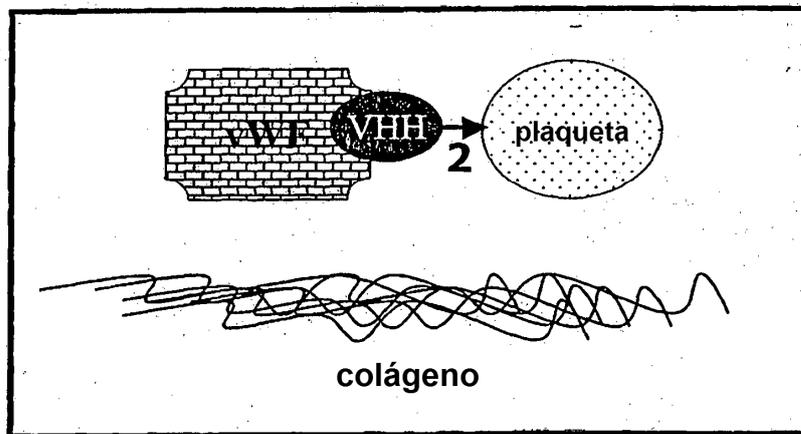


Figura 10



Figura 11

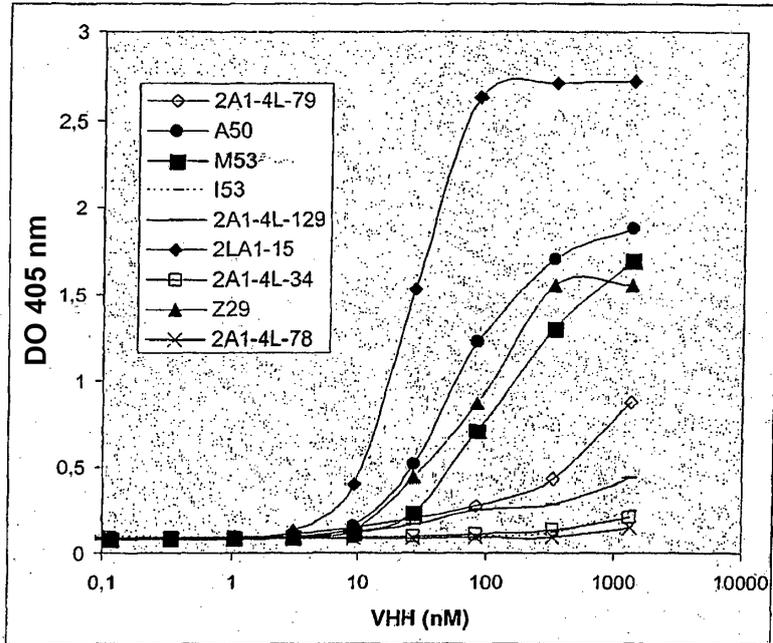


Figura 12

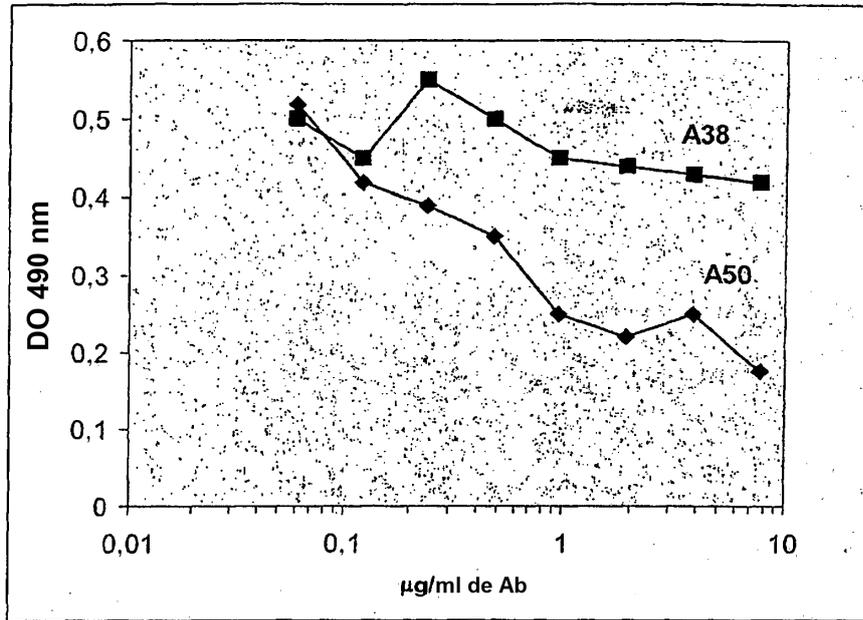


Figura 13

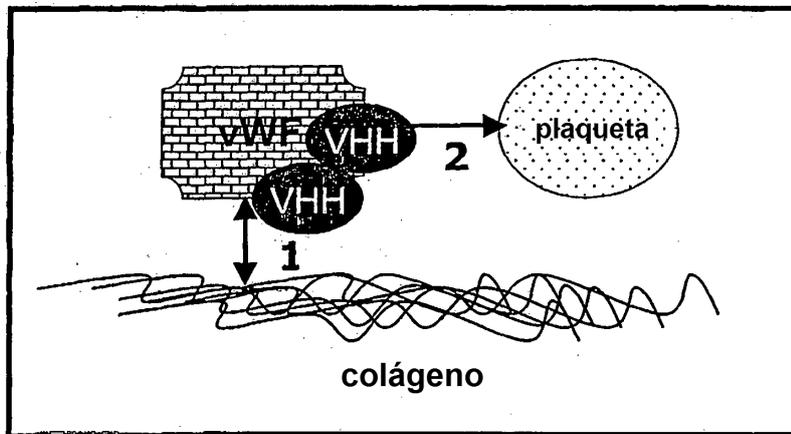


Figura 14

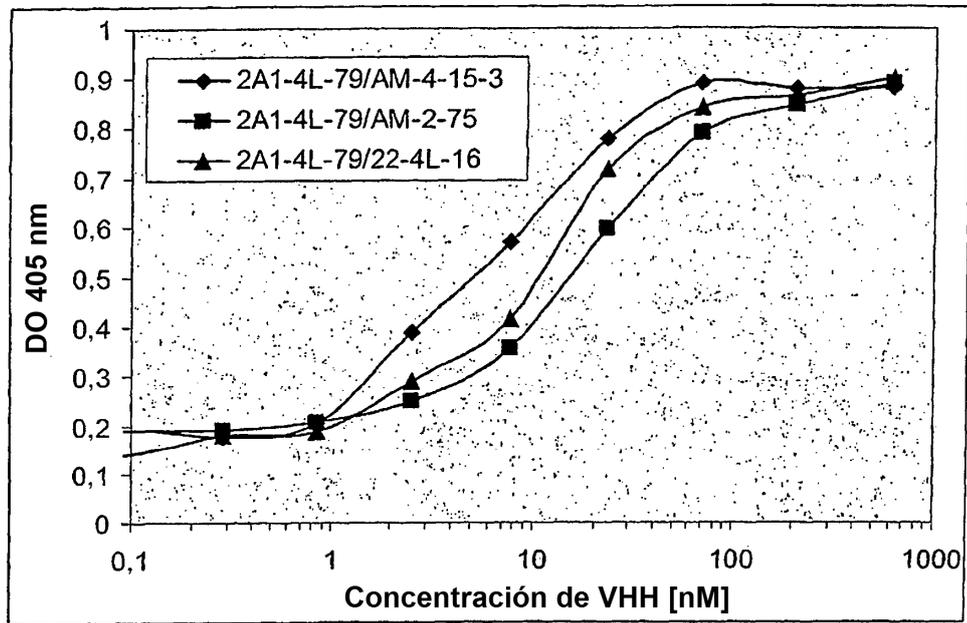


Figura 15

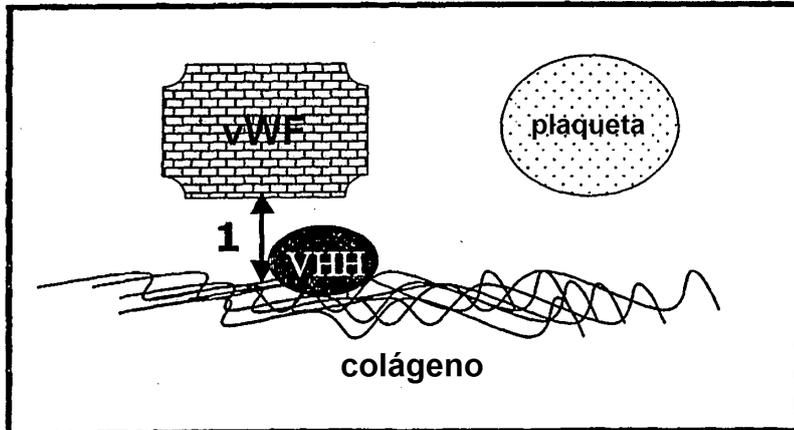


Figura 16

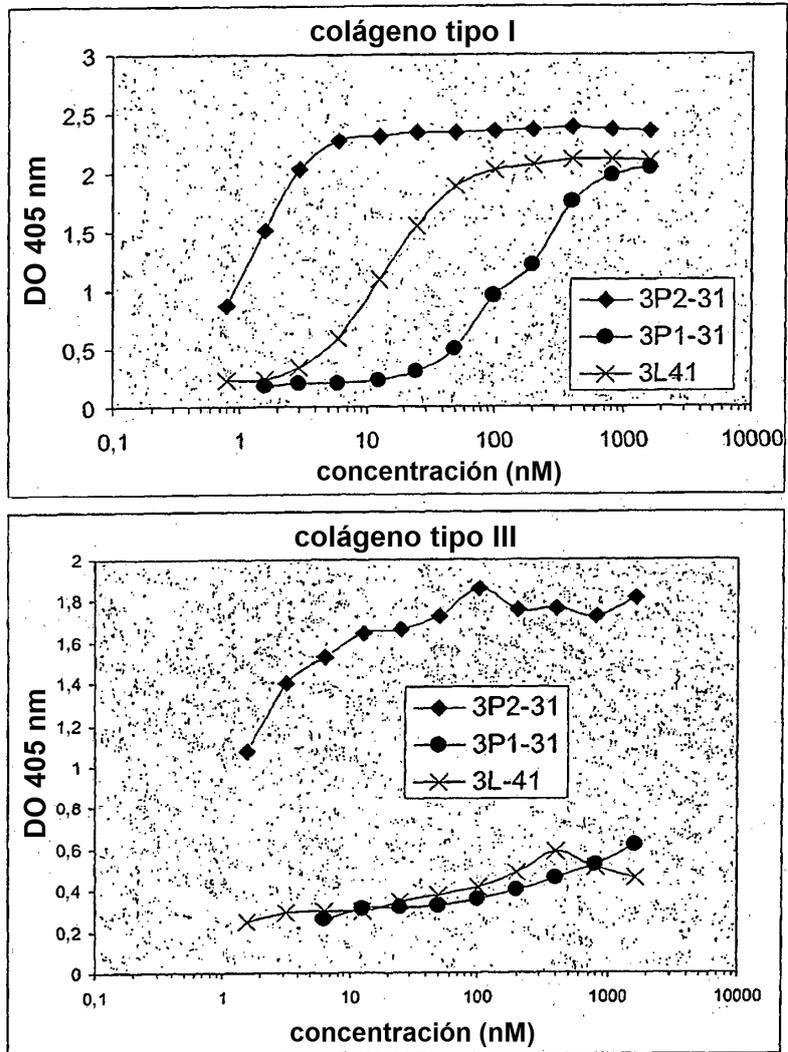


Figura 17

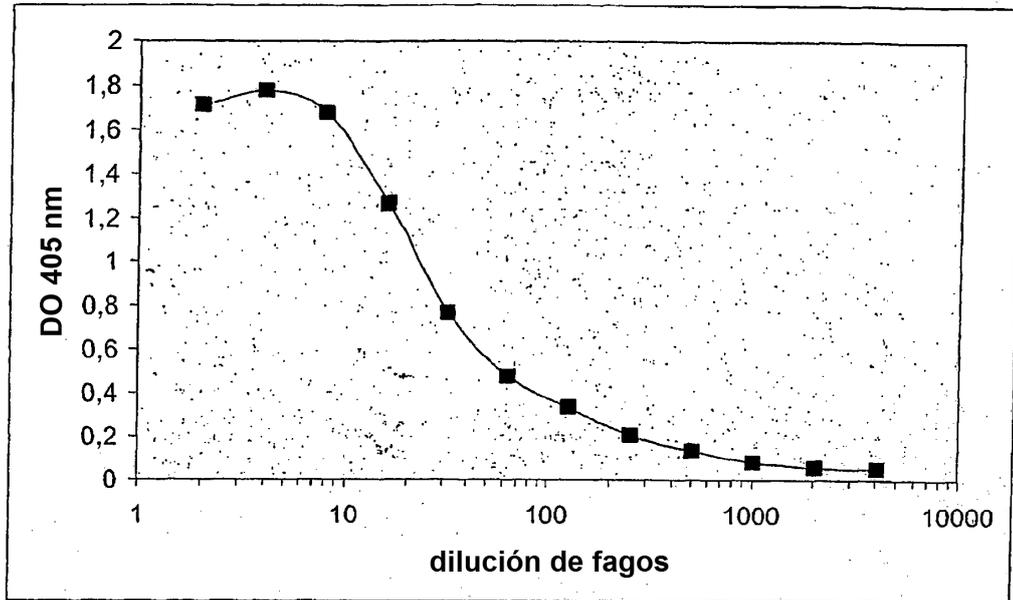


Figura 18

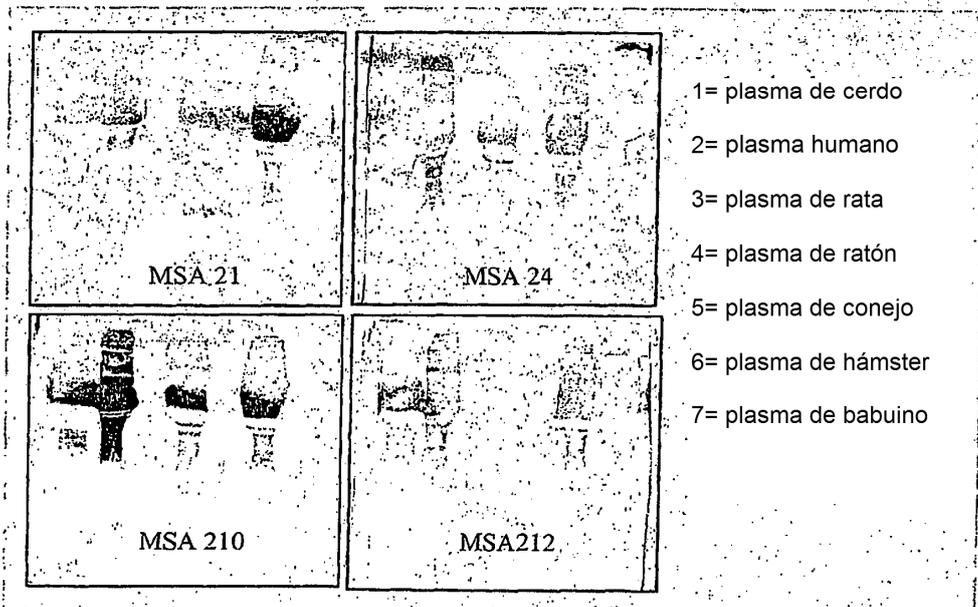


Figura 19

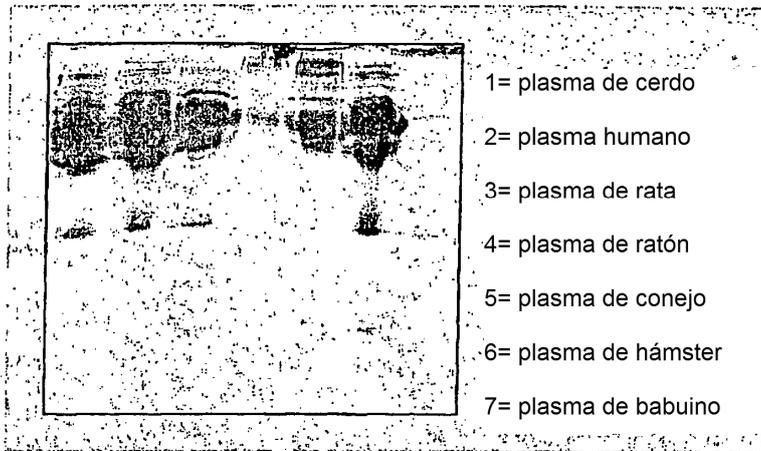


Figura 20

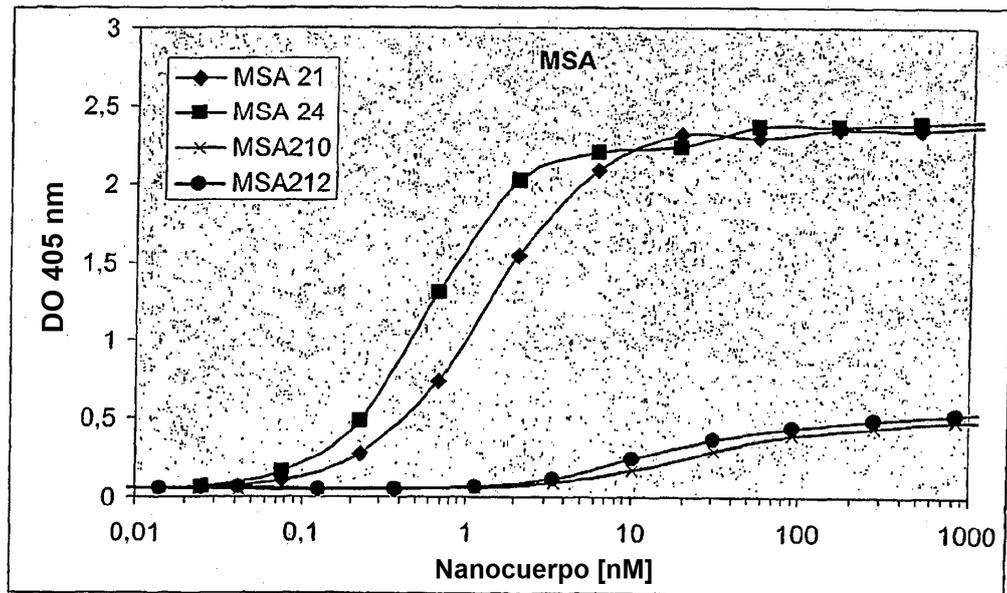


Figura 21

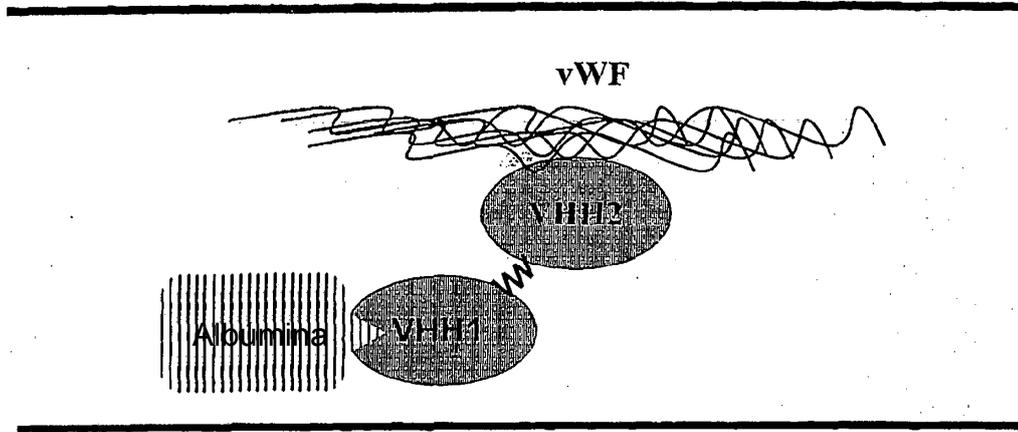


Figura 22

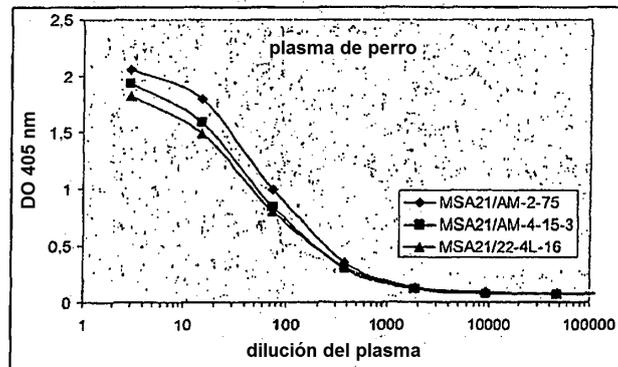
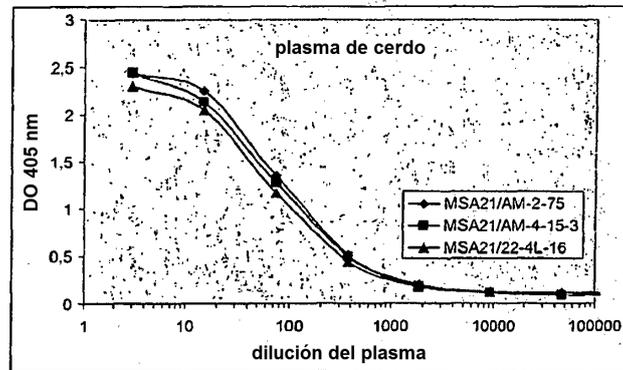
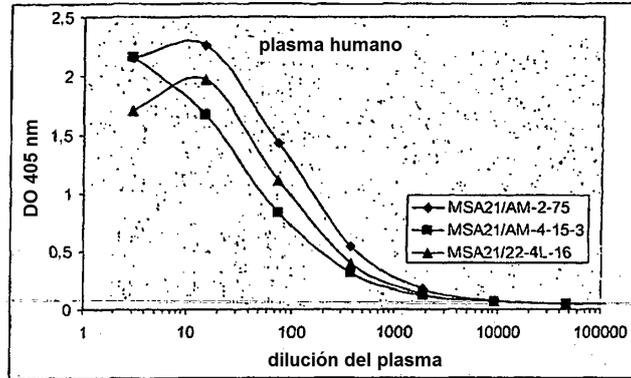


Figura 23

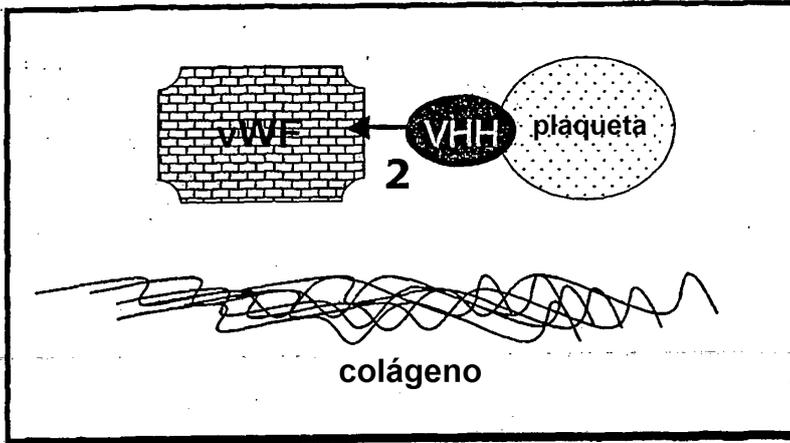


Figura 24

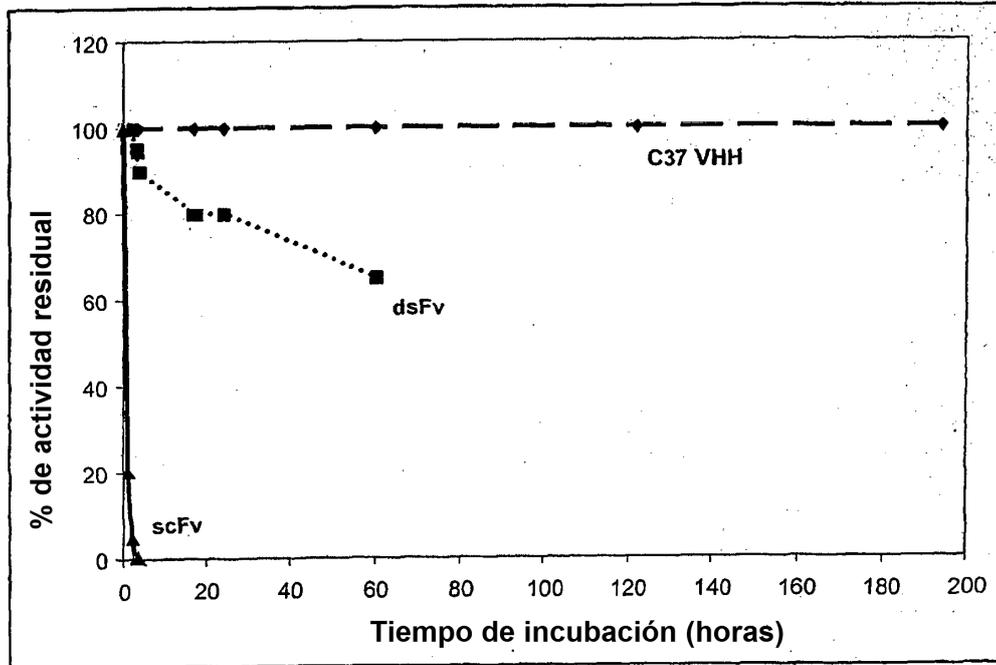


Figura 25

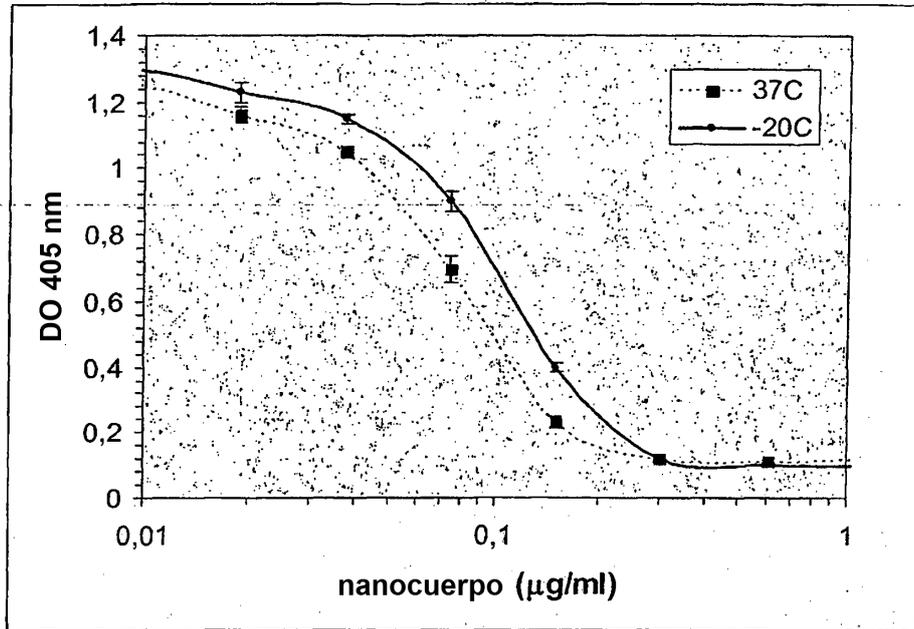


Figura 26

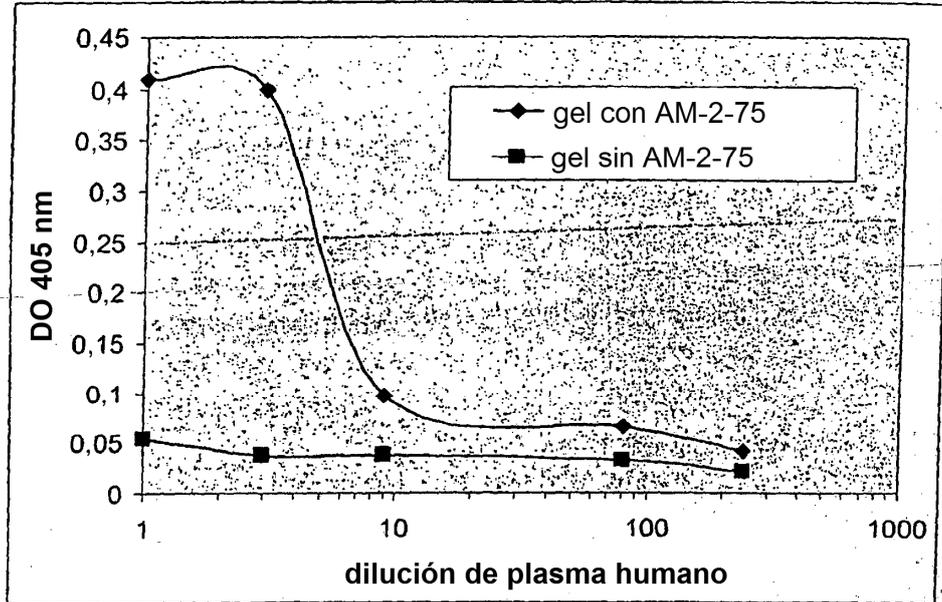


Figura 27

DP-47 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFS** SYAMS WVRQAPGKLEWVS AISGSGSTYY
 C-37 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFNFN** WYPMS WVRQAPGKLEWVS TISTYGEPRY-

DP-47 ADSVKG RFTISRDN**SKNTLYLQ**MNSLRAEDTAVYYCAK (SEC ID Nº 84)

C-37 ADSVKG RFTISRDN**ANNNTLYLQ**MNSLRPEDTAVYYCAR GAGTSSYLPQRGN WDQGTQVTISS
 (SEC ID Nº 85)

Figura 28

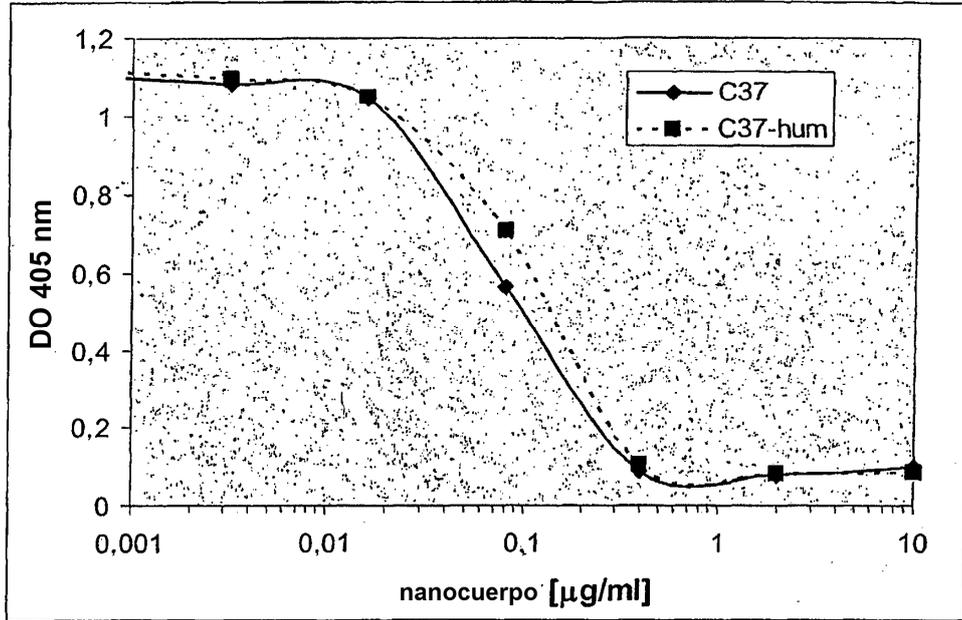


Figura 29

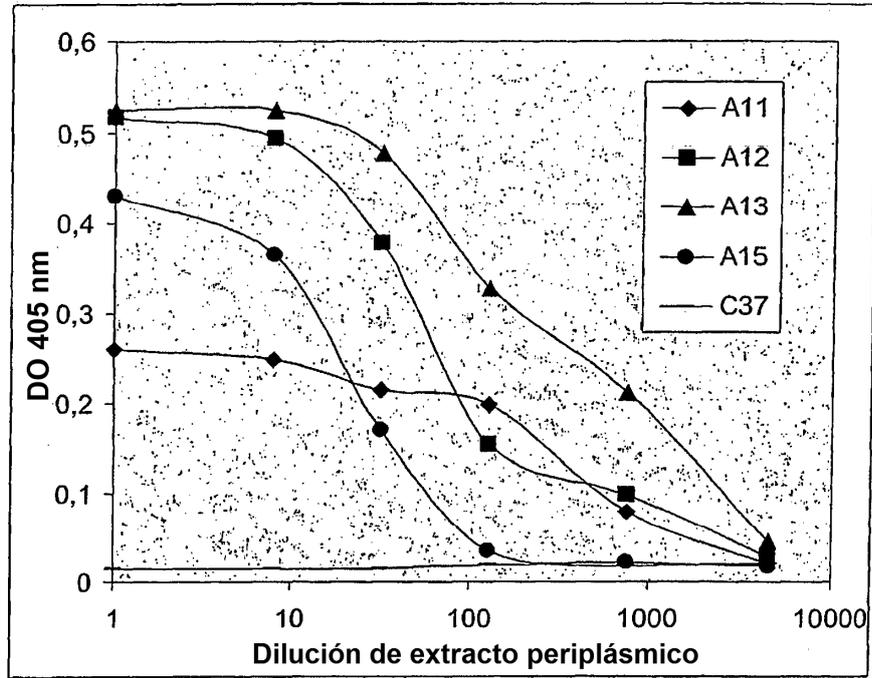


Figura 30

