

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 955**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2012 PCT/EP2012/066348**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13026878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2012 E 12751318 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2748196**

54 Título: **Nanocuerpos anti-VCAM-1**

30 Prioridad:

23.08.2011 FR 1157478

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES (33.3%)

621 avenue Centrale

38400 Saint Martin d'Hères, FR;

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE

GRENOBLE (33.3%) y

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (33.3%)

72 Inventor/es:

GHEZZI, CATHERINE;

FAGRET, DANIEL;

BROISAT, ALEXIS;

DEVOOGDT, NICK;

LAHOUTTE, TONY y

MUYDERMANS, SERGE

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 614 955 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

Nanocuerpos anti-VCAM-1

5 **[0001]** La presente invención se refiere a nanocuerpos anti-VCAM-1 que permiten la detección *in vivo* de placas de ateroma.

[0002] Las enfermedades cardiovasculares representan la primera causa mundial de mortalidad y la enfermedad coronaria es responsable por sí sola de más de la mitad de los fallecimientos. Los accidentes coronarios se deben, en la inmensa mayoría de los casos, a la ruptura de una placa de ateroma coronaria vulnerable. La coronografía, técnica de referencia actual para el diagnóstico de la enfermedad coronaria, no permite la identificación de las placas no estenosantes.

[0003] El diagnóstico por imagen nuclear presenta, sin duda, ventajas significativas para el diagnóstico por imagen molecular de la placa de ateroma vulnerable. Para el diagnóstico por imagen molecular, se han evaluado experimentalmente numerosos indicadores de diferente naturaleza química, entre los que se encuentran lipoproteínas, péptidos, oligopéptidos, anticuerpos, azúcares, nucleótidos de hebra no codificante y nanopartículas (Riou et al. (2009) Curr. Med. Chem. 16:1499-1511). Los principales objetivos evaluados han sido las LDL oxidadas y sus receptores, el fenómeno inflamatorio mediante técnicas de imagen celular de los macrófagos, o las técnicas de imagen de los receptores o enzimas expresados por este tipo celular, el fenómeno apoptótico y el fenómeno neovascular. Entre los marcadores dirigidos al proceso inflamatorio, el ^{99m}Tc -MCP-1 para la tomografía SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) y el $^{18\text{F}}$ -FDG para la tomografía PET (Positron Emission Tomography) han permitido el diagnóstico por imagen *in vivo* no invasivo de la acumulación de macrófagos en lesiones ateroscleróticas experimentales. En el ámbito clínico, $^{18\text{F}}$ -FDG y ^{99m}Tc -Annexin A5 han permitido el diagnóstico por imagen no invasivo de la acumulación de macrófagos y de células apoptóticas, respectivamente, en las placas de ateroma carotídeas de pacientes sintomáticos. Sin embargo, ninguno de estos radiomarcadores se utiliza actualmente en práctica clínica de forma rutinaria, principalmente debido a su incapacidad para alcanzar índices suficientes de lesiones sobre ruido de fondo en las lesiones coronarias. De hecho, el diagnóstico por imagen nuclear de las placas vulnerables en las arterias coronarias es especialmente difícil, debido al reducido volumen de las lesiones y a su cercanía con la sangre que contiene un marcador circulante no unido. Por ello, no existe ningún ensayo clínico que a día de hoy demuestre la viabilidad del diagnóstico por imagen del ateroma coronario.

[0004] VCAM-1 es una glicoproteína de la familia de las inmunoglobinas cuya expresión se induce en condición proaterogénica. Su expresión se restringe a las zonas de desarrollo de las placas de ateroma y perdura durante todo el desarrollo de la placa vulnerable. La función de VCAM-1 es garantizar que se reclutan células de la inflamación (linfocitos y monocitos) hacia la placa. La expresión de VCAM-1, por tanto, está en correlación directa con la acumulación de macrófagos, que está reconocida como uno de los criterios más importantes en la definición de una placa vulnerable (Naghavi et al. (2003) Circulation 108:1772-1178).

40 RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] La solicitud europea EP 2 206 726 describe el uso de derivados del péptido B2702p ligando de VCAM-1 en métodos de diagnóstico por imagen *in vivo*, no invasivos.

45 **[0006]** Anteriormente, los presentes inventores han desarrollado radiomarcadores que contenían una secuencia peptídica capaz de unirse a VCAM-1. Demostraron, sobre un modelo de conejo aterosclerótico, que la fijación de este radiomarcador en las imágenes autoradiográficas *ex vivo* estaba correlacionada con las zonas de desarrollo de las placas de ateroma y con la expresión de VCAM-1 (Broisat et al. (2007) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34:830-840). Sin embargo, debido a la actividad sanguínea circulante de este marcador, no es posible utilizarlo *in vivo* en técnicas de diagnóstico por imagen.

[0007] De hecho, de forma general, el cociente señal/ruido debe ser elevado para realizar un diagnóstico por imagen de calidad. Así, un radiomarcador ideal se caracteriza por una elevada afinidad y especificidad para su objetivo, una buena solubilidad y estabilidad, un radiomarcado eficaz, un reducido tamaño así como una eliminación sanguínea rápida, de forma que las imágenes con alto nivel de contraste puedan obtenerse rápidamente después de la administración del marcador. Esto es particularmente crucial en el caso de la placa de ateroma, por su reducido tamaño y su localización intravascular.

[0008] La presente invención es el resultado del descubrimiento por parte de los inventores de que cuatro nanocuerpos, llamados cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9, que contienen secuencias de CDR específicas, presentaban, de forma sorprendente, y contrariamente a otros nanocuerpos que se unen a VCAM-1, todas las características definidas anteriormente y por tanto constituían radiomarcadores eficaces para el diagnóstico por imagen no invasivo de las placas de ateroma, en particular de las placas de ateroma coronarias.

65 **[0009]** La presente invención tiene por objeto un nanocuerpo dirigido contra VCAM-1 que comprende:

- a) las secuencias de aminoácidos (i) YTNSIMYMA (SEQ ID NO: 1) como CDR1, (ii) AIRFPDDS (SEQ ID NO: 2) como CDR2 y (iii) RSSPYSFAWNPDSNYNY (SEQ ID NO: 3) como CDR3; o
 b) las secuencias de aminoácidos (i) FTYSSYYMS (SEQ ID NO: 4) como CDR1, (ii) GINVDGSN (SEQ ID NO: 5) como CDR2 y (iii) GSGRDSYDCYSGSWCP (SEQ ID NO: 6) como CDR3; o
 5 c) las secuencias de aminoácidos (i) FTFSNYMT (SEQ ID NO: 7) como CDR1, (ii) RINSDGS (SEQ ID NO: 8) como CDR2 y (iii) GKSSV (SEQ ID NO: 9) como CDR3;
 d) las secuencias de aminoácidos (i) FTFSSYYMS (SEQ ID NO: 10) como CDR1, (ii) GINVDGSN (SEQ ID NO: 11) como CDR2 y (iii) GSGRDSYDCYSGSWCP (SEQ ID NO: 12) como CDR3;
- 10 o una variante funcionalmente conservadora del nanocuerpo definida en a), b), c) o d) que comprende una sustitución conservadora de uno o dos aminoácidos en, respectivamente una, dos o tres de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

15 **[0010]** La presente invención se refiere igualmente al nanocuerpo tal como se ha definido más arriba, para utilizarlo como agente de contraste en las técnicas de formación de por imagen *in vivo*, no invasivas, para utilizarlo en técnicas de diagnóstico o de pronóstico y para utilizarlo como medicamento.

[0011] Asimismo, tiene por objeto la utilización de dicho nanocuerpo para la detección *in vitro* de VCAM-1 en
 20 una muestra.

[0012] Por último se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho nanocuerpo asociado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 VCAM-1

[0013] El término «VCAM-1» o «vascular cell adhesion molecule 1» designa una proteína de adhesión celular cuya transcripción se induce en las células endoteliales pero que también se expresa por otros tipos celulares. VCAM-1 fue descubierta y clonada por Osborn et al. en el año 1989 (Osborn et al. (1989) Cell. 59:1203-1211).

30 VCAM-1 interactúa con la integrina $\alpha 4 \beta 1$, también llamada VLA-4 (Very Late Antigen 4), que se expresa de forma constitutiva por los linfocitos y los monocitos, especialmente. Como otras moléculas de adhesión, como la ICAM-1, 2 y 3, VCAM1 está implicada en la adhesión de los monocitos al endotelio durante la aterosclerosis. VCAM-1 interactúa igualmente con la integrina $\alpha 4 \beta 7$ para reclutar linfocitos en el intestino.

35 Nanocuerpos anti-VCAM

[0014] En el contexto de la presente invención, los términos «anticuerpos» e «inmunoglobulina» tienen el mismo significado y se utilizan indistintamente. En los anticuerpos convencionales, las dos cadenas pesadas están unidas una a la otra por puentes disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un puente
 40 disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera: las cadenas ligeras lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de un anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia diferentes. La cadena ligera comprende dos dominios: un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada comprende cuatro dominios: un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, conjuntamente llamados CH). Las regiones variables de
 45 cadena pesada (VH) y ligera (VL) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad del antígeno. Los dominios de las regiones constantes de la cadena ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes, como la asociación de cadenas de anticuerpos, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión con el complemento y la unión con los receptores Fc. El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina consistente en las porciones variables de una cadena ligera y de una cadena pesada. La
 50 especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el punto de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los puntos de combinación del anticuerpo están hechos de residuos que provienen principalmente de las regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Ocasionalmente, los residuos que provienen de las regiones no hipervariables o regiones «estructurales» («framework», FR) pueden influir en la estructura global del dominio y, por tanto, el punto de combinación.

55 **[0015]** En el contexto de la invención, el término «CDR» se refiere a las secuencias de aminoácidos, que juntas, definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un punto de unión nativo de una inmunoglobulina. La cadena pesada y ligera de una inmunoglobulina tienen, cada una, tres CDR, designados como H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 y L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 respectivamente. Un punto de unión con el antígeno
 60 incluye, por tanto, 6 CDR, que comprenden la totalidad de los CDR de una región variable de una cadena pesada y de una región variable de una cadena ligera.

[0016] El experto en la materia puede localizar los CDR en la secuencia de un anticuerpo o de un nanocuerpo, utilizando las técnicas antes descritas. Típicamente, los CDR pueden identificarse secuenciando el
 65 ADN del anticuerpo o del nanocuerpo con un sistema apropiado, como el 3730 XL DNA Analyser y ABI PRISM BigDye Terminator cyc, y analizando las secuencias así obtenidas con ayuda de bases de datos dedicadas como la

International ImMunoGeneTics database o IMTG (Lefranc (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55).

[0017] En el contexto de la invención, el término «región estructural», «framework» o «FR» hacen referencia a las secuencias de aminoácidos intercalados entre los CDR.

5

[0018] En el contexto de la invención, los términos «nanocuerpo», «nanobody», «VHH», «fragmento de anticuerpo VHH» y «anticuerpo de dominio único» se utilizan indistintamente y designan el dominio variable de la cadena pesada única de anticuerpo del tipo de los que se encuentran en los camélidos, que por naturaleza están desprovistos de cadenas ligeras. A falta de cadena ligera, los nanocuerpos tienen cada uno tres CDR, designados como CDR1, CDR2, y CDR3 respectivamente. Los nanocuerpos según la invención pueden ser, en particular, nanocuerpos de camellos, de dromedarios, de llamas o de alpacas. Preferentemente, los nanocuerpos según la invención son nanocuerpos de dromedarios.

[0019] Por «nanocuerpo dirigido contra VCAM-1» se entiende aquí un nanocuerpo capaz de unirse de forma selectiva a VCAM-1. Preferentemente, el nanocuerpo es específico de VCAM-1, es decir, que se une a VCAM-1, excluyendo cualquier otra molécula.

[0020] Los presentes inventores han identificado más precisamente cuatro nanocuerpos dirigidos contra VCAM-1 y que presentan características adicionales no esperadas que no poseen otros nanocuerpos anti-VCAM-1. Estos cuatro nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8, cAbVCAM1-9, presentan una reacción cruzada para VCAM-1 humana y murina, tienen una gran afinidad para VCAM-1 murina o humana, y se fijan muy fuertemente a las placas de ateroma *in vivo*, pero sin producir por ello un ruido de fondo en los órganos del paciente.

[0021] Estos cuatro nanocuerpos se han secuenciado:

25

- el nanocuerpo cAbVCAM1-5 presenta la secuencia de aminoácidos
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASGYTNSIMYMAWFRQAPGKKREG
VAAIRFPDDSAYYAGSVKGRFTISHDNAKNTVYLQMNNLNPEdTAMYYC
AARSSPYSAWNPSPNYNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 13),

30 - el nanocuerpo cAbVCAM1-3 presenta la secuencia de aminoácidos
QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTYSSYYMSWVRQAPGKGLE
WVSGINVDGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSSEDALYY
CATGSGRDSYDCYSGSWCPKGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 14),

- el nanocuerpo cAbVCAM1-8 presenta la secuencia de aminoácidos
35 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMTWVRRAPGKGLE
WVSRINSDGSTLYLPSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSSEDGWYY CVEGKSSVRGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:
15), y

- el nanocuerpo cAbVCAM1-9 presenta la secuencia de aminoácidos
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMSWVRQAPGKGLE
40 WVSGINVDGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSSEDALYY
CATGSGRDSYDCYSGSWCPKGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 16).

[0022] Los CDR de estos cuatro nanocuerpos se han secuenciado más específicamente, y son los siguientes:

45

- cAbVCAM1-5
 - CDR1: YTNSIMYMA (SEQ ID NO: 1)
 - CDR2: AIRFPDDS (SEQ ID NO: 2)
 - CDR3: RSSPYSAWNPSPNYNY (SEQ ID NO: 3)

50

- cAbVCAM1-3
 - CDR1: FTYSSYYMS (SEQ ID NO: 4)
 - CDR2: GINVDGSN (SEQ ID NO: 5)
 - CDR3: GSGRDSYDCYSGSWCP (SEQ ID NO: 6)

55

- cAbVCAM1-8
 - CDR1: FTFSNYMT (SEQ ID NO: 7)
 - CDR2: RINSDGS (SEQ ID NO: 8)
 - CDR3: GKSSV (SEQ ID NO: 9)

60

- cAbVCAM1-9
 - CDR1: FTFSSYYMS (SEQ ID NO: 10)
 - CDR2: GINVDGSN (SEQ ID NO: 11)
 - CDR3: GSGRDSYDCYSGSWCP (SEQ ID NO: 12)

65

[0023] El experto en la materia sabe que la combinación de los CDR1, CDR2 y CDR3 basta para definir un punto de unión con el antígeno. Por consiguiente, un objeto de la presente invención se refiere a un nanocuerpo dirigido contra VCAM-1 que comprende:

- 5 a) las secuencias de aminoácidos (i) SEQ ID NO: 1 como CDR1, (ii) SEQ ID NO: 2 como CDR2 y (iii) SEQ ID NO: 3 como CDR3; o
 b) las secuencias de aminoácidos (i) SEQ ID NO: 4 como CDR1, (ii) SEQ ID NO: 5 como CDR2 y (iii) SEQ ID NO: 6 como CDR3; o
 c) las secuencias de aminoácidos (i) SEQ ID NO: 7 como CDR1, (ii) SEQ ID NO: 8 como CDR2 y (iii) SEQ ID NO: 9 como CDR3; o
 10 d) las secuencias de aminoácidos (i) SEQ ID NO: 10 como CDR1, (ii) SEQ ID NO: 11 como CDR2 y (iii) SEQ ID NO: 12 como CDR3;

o una variante funcionalmente conservadora del nanocuerpo definida en a), b), c) o d) que comprende una sustitución conservadora de uno o dos aminoácidos en, respectivamente una, dos o tres de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

[0024] Asimismo, los inventores han secuenciado las regiones «estructurales» (FR) de estos nanocuerpos. Las secuencias correspondientes son las siguientes:

• cAbVCAM1-5

- 25 ○ Región FR1: QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO: 17)
 ○ Región FR2: WFRQAPGKKREGVA (SEQ ID NO: 18)
 ○ Región FR3: AYYAGSVKGRFTISHDNAKNTVYLQMNNLNPEDTAMYYCAA (SEQ ID NO: 19)
 ○ Región FR4: WGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 20)

• cAbVCAM1-3

- 30 ○ Región FR1: QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASG (SEQ ID NO: 21)
 ○ Región FR2: WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 22)
 ○ Región FR3: TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSSEDALYYCAT (SEQ ID NO: 23)
 ○ Región FR4: KGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 24)

• cAbVCAM1-8

- 35 ○ Región FR1: QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO: 25)
 ○ Región FR2: WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 26)
 ○ Región FR3: TLYLPSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSSEDGWYYCVE (SEQ ID NO: 27)
 ○ Región FR4: RGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 28)

• cAbVCAM1-9

- 40 ○ Región FR1: QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO: 29)
 ○ Región FR2: WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 30)
 ○ Región FR3: TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSSEDALYYCAT (SEQ ID NO: 31)
 ○ Región FR4: KGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 32)

[0025] Según un modo de realización particular, la invención se refiere a un nanocuerpo que comprende o consiste en el encadenamiento de las secuencias FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 como las que se han definido más arriba de uno de los nanocuerpos identificados por los inventores.

50 **[0026]** Preferentemente, el nanocuerpo según la invención es por tanto un nanocuerpo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada dentro del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, o una variante funcionalmente conservadora de este que comprenda una sustitución conservadora de uno o dos aminoácidos en uno, dos o tres de los CDR comprendidos respectivamente en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16. La variante funcionalmente conservadora tal y como se ha definido más arriba, puede comprender además una o varias sustituciones, en concreto, una o varias sustituciones conservadoras en las regiones respectivamente de las secuencias aminoácidas SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16 que no son CDR, como las regiones «estructurales», en concreto las regiones «estructurales» definidas más arriba. De forma más preferente todavía, el nanocuerpo según la invención es un nanocuerpo que comprende o
 55 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada dentro del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. Según la forma más preferente de todas, el nanocuerpo según la invención es un nanocuerpo que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13

65 **[0027]** En el contexto de la invención, la expresión «variante funcionalmente conservadora» hace referencia a las variantes en las que un aminoácido dado en un nanocuerpo según la invención es sustituido sin alterar la

conformación global y la función del nanocuerpo, incluyendo una sustitución de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares (por ejemplo, polaridad, potencial de unión de hidrógeno, acidez, alcalinidad, hidrofobia, presencia de un grupo aromático, etc). El experto en la materia conoce los aminoácidos que tienen propiedades similares. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina, aminoácidos hidrófilos-básicos que pueden ser intercambiables. De forma similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede sustituirse por la leucina, la metionina o la valina. Dichos cambios no deberían tener ningún o casi ningún efecto sobre el peso molecular aparente o el punto isoeléctrico del nanocuerpo. Un aminoácido natural puede sustituirse por un aminoácido no natural, como un aminoácido de configuración D, aminoácido beta o gamma.

10 [0028] En la siguiente tabla 1 se presentan ejemplos de sustituciones conservadoras

Tabla 1: Sustituciones conservadoras I

Característica de la cadena lateral	Aminoácido
No polar	G A P I L V
Polar sin carga	C S T M N Q
Polar con carga	D E K R
Aromático	H F W Y
Otros	N Q D E

15 [0029] Alternativamente, los aminoácidos conservadores pueden agruparse, como se describe en Lehninger (1975, Biochemistry, 2ª edición, Worth Publishers, Inc. New-York: NY., p. 71-77), como se indica en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Sustituciones conservadoras II

Característica de la cadena lateral	Aminoácido	
No polar	Alifático	A L I V P
	Aromático	F W
	Con contenido de azufre	M
	Frontera	G
Polar sin carga	Hidróxilo	S T Y
	Amidas	N Q
	Sulfhidrilo	C
	Frontera	G
Cargada positivamente (básico)		K R H
Cargada negativamente (ácido)		D E

20 [0030] Según otra alternativa, en la tabla 3 que aparece a continuación se presentan ejemplos de sustituciones conservadoras:

Tabla 3: Sustituciones conservadoras III

Residuo de origen	Ejemplo de sustitución
A	VLI
R	KQN
N	QHKR
D	E
C	S
G	N
E	D
H	NQKR
I	LVMAF
L	IVMAF
K	RQN
M	LFI
F	LVIA
P	G
S	T
T	S
W	Y
Y	WTFS
V	ILMFA

25 [0031] Estas variantes funcionalmente conservadoras conservan la capacidad de unir VCAM-1. Preferentemente, dichas variantes funcionalmente conservadoras presentan una afinidad de unión con VCAM-1

igual o aumentada respecto del nanocuerpo correspondiente.

[0032] El experto en la materia que conozca la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo de interés, es capaz de producir los nanocuerpos según la invención, en particular los nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9 definidos más arriba, mediante técnicas convencionales de producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse utilizando el método bien conocido de síntesis en fase sólida (Merrifield (19962) Proc. Soc. Ex. Boil. 21:412; Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Tam et al. (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:6442), preferentemente utilizando un aparato de síntesis peptídica disponible comercialmente (como el de Applied Biosystems, Foster City, California), y siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0033] Alternativamente, los nanocuerpos según la invención pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante conocidas por el experto en la materia (Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 51-54 et 412-430). Por ejemplo, pueden obtenerse como productos de expresión de ADN tras incorporación de secuencias de ADN codificante del polipéptido de interés en los vectores de expresión e introducción de dichos vectores en los anfitriones procariontas o eucariotas apropiados que expresarán el polipéptido de interés, a partir de los que, a continuación se podrán aislar utilizando técnicas conocidas por el experto en la materia. El experto en la materia sabe que cuando una proteína se sintetiza por técnicas de ADN recombinante, generalmente se sintetiza asociada a un marcador que facilite su purificación. Dichos marcadores son conocidos por el experto en la materia e incluyen por ejemplo la hexahistidina (6His), la glutatión-S-transferasa (GST) o la hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Preferentemente, los nanocuerpos según la invención contienen un marcador hexahistidina. Por consiguiente, un objeto de la invención también está constituido por un nanocuerpo que comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos elegida en el grupo constituido por las secuencias SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 que comprende además en su extremo C-terminal o N-terminal, preferentemente en su extremo C-terminal, seis residuos histidina. Un nanocuerpo que comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos elegida dentro del grupo constituido por las secuencias SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 también forma parte de la invención.

[0034] Otro objeto de la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleica codificante del nanocuerpo según la presente invención.

[0035] Según un modo de realización particular, el ácido nucleico según la invención comprende o consiste en una secuencia nucleica codificante de un nanocuerpo definido por una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16. De manera preferida, el ácido nucleico según la invención comprende o consiste en una secuencia nucleica codificante del nanocuerpo definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13.

[0036] Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o de ARN, que puede estar incluida en cualquier vector apropiado como un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un bacteriófago o un vector viral.

[0037] Los términos «vector», «vector de clonado» y «vector de expresión» significan el vehículo por el cual la secuencia de ADN o de ARN puede introducirse en la célula anfitriona, de forma que transforme al anfitrión y promueva la expresión (p. ej. transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

[0038] Por consiguiente, otro objeto de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico según la invención.

[0039] Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, como un promotor, un activador, un finalizador, para causar o dirigir la expresión del polipéptido. Algunos ejemplos de promotores y de activadores utilizados en los vectores de expresión para célula animal incluyen el promotor precoz y el activador de SV40 (Mizukami et al. (1987) J. Biochem. 101:1307-1310), el promotor LTR y el activador de virus de la leucemia del ratón Moloney, el promotor (Mason et al (1985) Cell 14:479-487) y el activador (Gillies et al. (1983) Cell 33:717-728) de la cadena de la inmunoglobulina, etc.

[0040] Se puede usar cualquier vector de expresión para células animales. Algunos ejemplos de vectores apropiados incluyen pAGE107 (Miyaji et al. (1990) Cytotechnology 3:133-140), pAGE 103 (Mizukami et al. (1987) J. Biochem. 101:1307-1310), pHSG274 (Brady et al. (1984) Gene 27:223-232), pKCR (O'Hare et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527-1531), pSG1 beta d2-4 (Miyaji et al. (1990) Cytotechnology 3:133-140), etc.

[0041] Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos multiplicadores, que comprenden un origen de multiplicación, o plásmidos integrativos, como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR, etc.

[0042] Otros ejemplos de vectores virales incluyen los vectores adenovirales, retrovirales del virus del herpes y AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas para el experto en la materia, como la transfección de células de empaquetamiento o por transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Algunos ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen las células PA317, las células PsiCRIP, las células GEnv+, las células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados de producción de dichos virus

recombinantes deficientes para su multiplicación, por ejemplo en las solicitudes WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,887, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 94/19478.

5 **[0043]** Otro objeto de la presente invención se refiere a una célula que ha sido transinfectada, infectada o transformada con un ácido nucleico y/o un vector según la invención.

10 **[0044]** El término «transformación» significa la introducción de un gen o de una secuencia de ADN o de ARN «exógeno» (i.e. extrínseco o extracelular) en una célula anfitriona, de forma que la célula anfitriona expresará el gen o la secuencia introducida para producir la sustancia de interés, típicamente una proteína codificada por el gen o la secuencia introducida. Una célula anfitriona que recibe y expresa el ADN o el ARN introducido ha sido «transformada».

15 **[0045]** Los ácidos nucleicos según la invención pueden utilizarse para producir un nanocuerpo según la invención en un sistema de expresión apropiado. El término «sistema de expresión» significa una célula anfitriona y un vector compatible en condiciones apropiadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por el ADN exógeno transportado por el vector e introducido en la célula anfitriona.

20 **[0046]** Los sistemas de expresión convencionales incluyen las células anfitrionas *Escherichia coli* y los vectores plasmídicos, las células de insecto y los vectores Baculovirus, y las células anfitrionas de mamífero y sus vectores. Otros ejemplos de células anfitrionas incluyen las células procariontas (como las bacterias), y las células eucariotas (como las células de levadura, las células de mamífero, las células de insecto, las células de plantas, etc.). Otros ejemplos específicos incluyen la *Escherichia coli*, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, las estirpes celulares de mamífero (por ej. las células Vero, las células CHO, las células 3T3, las células COS, etc.), así como los cultivos de células de mamíferos primarias o establecidas (es decir producidas a partir de linfoblastos, fibroblastos, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Algunos ejemplos incluyen igualmente células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), las células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), las células CHO en las que un gen del dihidrofolato reductasa es defectuoso, las células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662), etc.

30 **[0047]** La presente invención se refiere asimismo a un método de producción de una célula anfitriona recombinante que expresa un nanocuerpo según la invención, dicho método comprende las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico o un vector recombinante como el que se ha descrito más arriba en una célula anfitriona competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula anfitriona recombinante obtenida y (iii) eventualmente seleccionar las células que expresan o secretan dicho nanocuerpo. Dichas células anfitrionas recombinantes pueden utilizarse para la producción de nanocuerpos según la invención.

[0048] Los nanocuerpos según la invención se pueden producir con cualquier técnica conocida por el experto en la materia, como por ejemplo cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación.

40 **[0049]** En particular, la invención se refiere además a un método de producción de un nanocuerpo según la invención, dicho método comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula anfitriona transformada según la invención en condiciones apropiadas para permitir la expresión de dicho nanocuerpo, y (ii) recuperar el nanocuerpo expresado.

45 **[0050]** Los nanocuerpos según la invención pueden separarse convenientemente del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, como la proteína A-Sefarosa, la cromatografía con hidroxipatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

Nanocuerpos marcados.

50 **[0051]** Los nanocuerpos según la invención son particularmente útiles para la formación de imagen médica. En el presente contexto, es particularmente interesante disponer de nanocuerpos asociados a un marcador detectable. Los presentes inventores han demostrado que los nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9 conservaban sus propiedades cuando se asociaban a un marcador detectable, en particular, un radioelemento como el tecnecio ^{99m}.

[0052] Por tanto, la presente invención también se refiere a un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba asociado a un marcador detectable.

60 **[0053]** Por «nanocuerpo asociado a un marcador detectable», aquí se entiende que el marcador detectable está unido, de forma directa o indirecta, al nanocuerpo, o está incorporado en el nanocuerpo. En concreto, el marcador detectable puede estar unido al nanocuerpo por sustitución (por ejemplo, sustituyendo un H por un I en los residuos tirosina), por complejón o por quelación.

65 **[0054]** Por «marcador detectable» se entiende aquí un compuesto que produce una señal detectable. Cuando se asocia a un marcador, permite seguir el devenir del marcador en el organismo. El marcador detectable

puede ser un agente de contraste para MRI, un agente de contraste para gammagrafía un agente de contraste para diagnóstico por imagen por rayos X, un agente de contraste para ultrasonido, un agente de contraste para diagnóstico por imagen óptica. Algunos ejemplos de marcadores detectables incluyen radioelementos, fluoróforos como la fluoresceína, la Alexa, la cianina, los compuestos quimioluminescentes como el luminol, los compuestos bioluminescentes como la luciferasa o la fosfatasa alcalina, y los agentes de contraste como las nanopartículas o el gadolinio. La elección del marcador detectable apropiado, que depende del sistema de detección utilizado, está al alcance del experto en la materia. A modo de ejemplo, cuando el sistema de detección es la MRI, el marcador detectable es preferentemente una nanopartícula de óxido de hierro o de gadolinio; cuando el sistema de detección es la formación de imagen por nanofluorescencia, el marcador detectable es preferentemente la fluoresceína, el Alexa o la cianina; cuando el sistema de detección es la formación de imagen por quimioluminescencia, el marcador detectable es preferentemente el luminol; cuando el sistema de detección es la formación de imagen por bioluminescencia, el marcador detectable es preferentemente la luciferasa o la fosfatasa alcalina; cuando el sistema de detección es la formación de imagen nuclear, el marcador detectable es preferentemente un radioelemento como el Flúor 18 (^{18}F) para la tomografía TEP, o el tecnecio $^{99\text{m}}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) para la tomografía SPECT.

15 **[0055]** Preferentemente, el marcador detectable es un radioelemento. Algunos ejemplos de radioelementos, que son utilizados más particularmente en las técnicas de diagnóstico por imagen nuclear incluyen el Tecnecio $^{99\text{m}}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), el yodo 123 (^{123}I), el yodo 125 (^{125}I), el indio 111 (^{111}In), el flúor 18 (^{18}F), el galio 67 (^{67}Ga), el galio 68 (^{68}Ga), el cobre 64 (^{64}Cu) y cualquier otro radioelemento utilizable en los seres humanos. Por consiguiente, 20 preferentemente, el radioelemento se elige en el grupo constituido por $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{111}In , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga . De forma más preferentemente entre todas, el radioelemento es el $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Uso como agente de contraste

25 **[0056]** Los inventores han demostrado que los nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9 constituían marcadores específicos de la placa de ateroma, en concreto de la placa aórtica, y permiten su detección mediante formación de imagen médica.

30 **[0057]** Por tanto, la invención propone un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba, para usarlo como agente de contraste en la formación de imagen médica en concreto, en la formación de imagen médica *in vivo*, no invasiva.

35 **[0058]** Igualmente, se refiere al uso de un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba, para fabricar un agente de contraste útil para la formación de imagen médica en concreto, en la formación de imagen médica *in vivo*, no invasiva.

40 **[0059]** Por «agente de contraste», se entiende aquí una sustancia o un compuesto que, administrado en el organismo, permite marcar de forma detectable órganos o estructuras (tejido, célula, receptor) que, sin agente de contraste, son poco o nada visibles en la formación de imagen médica. Por extensión, la expresión «agente de contraste» se utiliza para designar un marcador asociado a un indicador como el que se ha definido más arriba.

45 **[0060]** En el contexto de la invención, los «métodos de formación de imagen» se refieren a métodos que permite visualizar el interior de un organismo u órganos de un organismo. Los ejemplos de métodos de formación de imagen incluyen técnicas invasivas como la ecografía endocoronaria, y técnicas no invasivas como la formación de imagen por resonancia magnética, con rayos X, la ecografía, la formación de imagen óptica o la medicina nuclear como la gammagrafía en particular, la tomografía de emisión monofotónica (SPECT) y la tomografía de emisión de positrones (PET). Preferentemente, el método de formación de imagen según la invención es la gammagrafía, en particular la gammagrafía SPECT o PET.

50 **[0061]** La gammagrafía se basa en la administración (generalmente por vía intravenosa) de un agente de contraste, también llamado radiofarmacéutico, constituido por un marcador marcado por un radioelemento. La localización específica de este agente de contraste en el organismo se determina después por detección de los rayos gamma o beta emitidos.

55 **[0062]** La tomografía de emisión monofotónica y la tomografía por emisión de positrones son técnicas de formación de imagen nuclear tomográfica basadas en la gammagrafía y que permiten realizar imágenes y reconstrucciones en tres dimensiones de los órganos y de su metabolismo por medio de un conjunto de cámaras que giran alrededor del paciente.

60 **[0063]** La presente invención se refiere igualmente a una técnica de formación de imagen médica, en concreto de formación de imagen médica *in vivo*, no invasiva, en la que un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba se administra a un paciente. El método de formación de imagen médica según la invención puede comprender además las etapas de detección del enlace o de la ausencia de enlace del nanocuerpo en las zonas corporales del paciente y de visualización de las zonas corporales del paciente en las que puede detectarse la unión del nanocuerpo.

65

[0064] En el contexto de la invención, un «paciente» designa un mamífero humano o no humano, como un roedor (rata, ratón, conejo), un primate (chimpancé) un félido (gato), un cánido (perro). Preferentemente, el individuo es humano.

5 **[0065]** Cualquier método de administración, conocido por el experto en la materia, puede utilizarse para administrar al paciente el nanocuerpo según la invención. En particular, el nanocuerpo puede administrarse por ejemplo por vía oral, por inhalación o por vía parenteral (en particular por inyección intravenosa). Cuando se elige la vía parenteral, el nanocuerpo puede estar en forma de soluciones o de suspensiones inyectables, envasado en ampollas o frascos. Las formas de administración parenteral se obtienen convencionalmente por mezcla del
10 nanocuerpo según la invención con amortiguadores, estabilizantes, conservadores, agentes solubilizantes, agentes isotónicos y agentes de puesta en suspensión. Según técnicas conocidas, estas mezclas pueden esterilizarse y prepararse en forma de inyecciones intravenosas. El experto en la materia puede, por ejemplo, utilizar amortiguadores a base de sales de fosfato en calidad de amortiguadores. Algunos ejemplos de agentes de puesta en suspensión incluyen la metilcelulosa, la goma arábiga, y la carmelosa de sodio. Algunos ejemplos de
15 estabilizantes incluyen el sulfito de sodio y el metasulfito de sodio, y algunos ejemplos de conservadores incluyen el p-hidroxibenzoato de sodio, el ácido sórbico, el cresol y el clorocresol.

[0066] La cantidad de nanocuerpos administrada depende naturalmente de la vía de administración, del tamaño y/o del peso del paciente y de la técnica de detección utilizada.

20 **[0067]** En el contexto de la invención, el término «zona corporal» hace referencia a una región determinada del organismo. Puede tratarse, por ejemplo, de un órgano, de una parte de un órgano o de un tejido, como un pulmón, el corazón, el hígado, el bazo o un riñón, o un vaso sanguíneo como una arteria o una vena, en particular la aorta o las arterias coronarias.

25 **[0068]** En un modo de realización particular, el nanocuerpo según la invención se utiliza como agente de contraste en el la formación de imagen médica para visualizar placas ateroscleróticas, más concretamente, placas ateroscleróticas aórticas, carótideas o coronarias, en un paciente.

30 **[0069]** En el contexto de la invención, los términos «placa aterosclerótica», «placa de aterosclerosis» y «placa de ateroma», se utilizan indiferentemente y hacen referencia a una lesión de las paredes de los vasos. Preferentemente, una placa aterosclerótica comprende un corazón lipídico y una capa fibrosa, la capa está constituida por células de músculo liso, de colágenos y de una matriz extracelular y que aísla el núcleo lipídico de la luz arterial. Las placas ateroscleróticas pueden encontrarse por ejemplo en la aorta, la carótida o en la arteria
35 coronaria. Cuando la placa comprende una capa fibrosa fina (de 65 a 150 mm de grosor aproximadamente) y un núcleo lipídico importante, se denomina «placa vulnerable» o «placa inestable». Estas placas inestables que presentan una tendencia a la ruptura, se unen en las arterias coronarias y en la aorta y sus ramas. La ruptura de las placas coronarias vulnerables provoca «síndromes coronarios agudos». En caso de trombosis oclusiva completa, se trata del infarto de miocardio. Cuando la trombosis de la arteria es incompleta, se trata de la angina inestable. En la
40 carótida, las placas vulnerables son más estenosantes y menos inflamatorias. Expresan igualmente VCAM-1.

[0070] Preferentemente, el nanocuerpo según la invención se utiliza como agente de contraste en la formación de imagen médica para visualizar placas ateroscleróticas vulnerables, en concreto, placas vulnerables aórticas o coronarias.

45 *Uso diagnóstico*

[0071] La aparición de placas de ateroma es una marca de la aterosclerosis, que constituye en sí misma una enfermedad cardiovascular y puede generar diferentes complicaciones cardiovasculares. La detección de placas de ateroma supone por tanto, la caracterización de una enfermedad cardiovascular. Por otro lado, la posibilidad de seguir a través de técnicas de formación de imagen la evolución, es decir, la progresión o la regresión, de una placa de ateroma previamente identificada representa una modalidad para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico en un paciente al que se ha diagnosticado una enfermedad cardiovascular.

55 **[0072]** La presente invención se refiere por tanto igualmente a un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba, para utilizarlo en métodos de diagnóstico o de pronóstico.

[0073] Por «método diagnóstico» o «diagnóstico», se entiende aquí un método que permite determinar si un individuo sufre una patología.

60 **[0074]** Por «método pronóstico» o «pronóstico», se entiende aquí un método que permite determinar si un individuo es susceptible de desarrollar una patología.

[0075] Preferentemente, le nanocuerpo como se ha definido más arriba se utiliza para el diagnóstico de
65 enfermedades cardiovasculares.

[0076] En el contexto de la presente invención, se designa por «enfermedad vascular» una enfermedad, una lesión, o un síntoma relacionado con un proceso de aterogénesis que afecte al sistema cardiovascular. Esto incluye, en concreto, los estados que marcan el desarrollo de una placa de ateroma (las placas están clasificadas en estados de progresión I a VI, según la clasificación internacional de Stary), así como las complicaciones que derivan de la formación de una placa de ateroma (estenosis, isquemia), y/o de su evolución hacia un accidente isquémico agudo (trombosis, embolia, infarto, ruptura arterial). Las enfermedades cardiovasculares designan por ejemplo aterosclerosis, una placa de ateroma, en particular la placa vulnerable, la enfermedad coronaria, la angina de pecho, la trombosis, el accidente vascular cerebral, el infarto de miocardio, la estenosis vascular, el infarto. Preferentemente, el nanocuerpo según la invención se utiliza para diagnosticar la aterosclerosis o una enfermedad coronaria.

[0077] Por «aterosclerosis» se entiende aquí una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos arteriales. La aterosclerosis puede caracterizarse por una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias, principalmente debida a la acumulación de macrófagos y promovida por lipoproteínas de baja densidad.

[0078] La «enfermedad coronaria» es la manifestación más corriente de la enfermedad cardiovascular. Se trata de una enfermedad progresiva, debida a una mala irrigación del músculo cardíaco, derivada del estrechamiento (estenosis) o de la calcificación (esclerosis) de una o de las arterias coronarias. El síntoma principal de la enfermedad coronaria se manifiesta en forma de dolores que constituyen una angina (estable o inestable), también llamada angina de pecho. La obstrucción completa de una o de las arterias coronarias conduce al infarto.

[0079] El «infarto» designa un foco de necrosis circunscrito debido a una obstrucción arterial. Más específicamente, el infarto de miocardio es una necrosis del miocardio que deriva generalmente de una trombosis coronaria aguda, secundaria a una ruptura de placa (generalmente una placa vulnerable) que acarrea la agregación plaquetaria y la oclusión coronaria.

[0080] La presencia de una placa de ateroma coronaria, sobre todo si se trata de una placa inestable, expone al sujeto a un riesgo de accidente isquémico agudo, en particular, un infarto de miocardio. El nanocuerpo según la invención puede por tanto utilizarse para detectar un riesgo de sobrevenida de un accidente isquémico agudo, en particular, un riesgo de sobrevenida de un infarto de miocardio, en un paciente.

[0081] Por «riesgo de sobrevenida» se entiende aquí la probabilidad de que un individuo desarrolle una patología.

[0082] El «accidente isquémico agudo» designa la disminución del aporte sanguíneo arterial en un territorio del organismo. Sus principales causas locales son la trombosis y la embolia.

[0083] La «trombosis» corresponde a la coagulación de la sangre en las cavidades vasculares (arterias, venas, capilares o cavidades cardíacas) que conducen a la formación de un trombo.

[0084] La «embolia» es la migración de un cuerpo extraño, a menudo constituido por un coágulo sanguíneo (trombo), y su parada brusca en un vaso cuyo calibre es insuficiente para dejarlo pasar. Las consecuencias locales de la embolia son perturbaciones circulatorias relacionadas con la obstrucción vascular, que suelen conducir a menudo a un infarto.

[0085] La placa de ateroma a menudo puede localizarse en una arteria carótida. Dichas lesiones conducen a accidentes vasculares cerebrales, hemorrágicos (ruptura de aneurisma) o isquémicos (infarto cerebral). El nanocuerpo según la invención puede por tanto utilizarse para detectar un riesgo de sobrevenida de un accidente vascular cerebral en un paciente.

[0086] Además, puede tratarse de una placa de ateroma localizada en una arteria renal, dado que el riñón es uno de los órganos a los que afecta la aterosclerosis. Una estenosis importante puede conducir a una hipertensión arterial y/o una insuficiencia renal. La afectación ateromatosa de las arterias renales puede conducir igualmente a un accidente vascular agudo, la embolia renal. El nanocuerpo según la invención puede por tanto utilizarse para detectar un riesgo de sobrevenida de una embolia renal en un paciente.

[0087] Las placas de ateroma pueden localizarse en las arterias de los miembros inferiores (riesgo de isquemia aguda de un miembro), o de la aorta (riesgo de ruptura de aneurisma/disección aórtica). El nanocuerpo según la invención puede por tanto utilizarse para detectar un riesgo de sobrevenida de una isquemia de un miembro o de ruptura de aneurisma aórtico en un paciente.

[0088] Por consiguiente, el nanocuerpo como se ha definido aquí arriba se usa preferentemente para detectar el riesgo de sobrevenida de un accidente isquémico agudo seleccionado dentro del grupo constituido por el infarto de miocardio, el accidente vascular cerebral, la embolia arterial renal y el accidente isquémico agudo de un miembro.

[0089] La presente invención se refiere igualmente a un método, en particular un método *in vivo*, de

diagnóstico de una enfermedad cardiovascular y/o de detección de un riesgo de sobrevenida de un accidente isquémico agudo en un paciente, dicho método comprende las etapas que consisten en administrar un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba a dicho paciente y en detectar dicho nanocuerpo en el organismo de dicho paciente, la detección de una localización preferente de dicho nanocuerpo a nivel del sistema cardiovascular es 5 indicador de una enfermedad cardiovascular y/o de un riesgo de sobrevenida de un accidente isquémico agudo.

[0090] Por «localización preferente» se entiende que la cantidad de nanocuerpo detectada en el sistema cardiovascular es superior al ruido de fondo que corresponde a una localización no específica del nanocuerpo en el organismo.

10

[0091] La invención se refiere asimismo al nanocuerpo como se ha definido más arriba para utilizarlo en el seguimiento terapéutico de una enfermedad cardiovascular en un sujeto al que se le haya diagnosticado una enfermedad cardiovascular.

15 **[0092]** También se refiere a la utilización del nanocuerpo como se ha definido más arriba para la fabricación de un agente de contraste útil para el seguimiento terapéutico de una enfermedad cardiovascular en un sujeto al que se le haya diagnosticado una enfermedad cardiovascular.

[0093] Por «seguimiento terapéutico» se entiende aquí la observación de la respuesta del sujeto al 20 tratamiento que se le ha administrado. El efecto terapéutico de un tratamiento generalmente se asocia a una disminución o una inhibición de la progresión de una enfermedad, a una reversión de la enfermedad o de uno o varios síntomas asociados a esta enfermedad. A la inversa, una ausencia de efecto terapéutico puede traducirse por una estabilidad o una aceleración de la progresión de la enfermedad o de uno o varios de sus síntomas.

[0094] Por ejemplo, si la enfermedad cardiovascular en el sentido de la invención es una placa de ateroma, el 25 seguimiento terapéutico puede realizarse observando la desaparición, la regresión, la continuidad o el crecimiento de la placa de ateroma. Así, el uso según la invención puede comprender las siguientes etapas:

a) administrar un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba a un sujeto al que se haya detectado una placa de ateroma;

30 b) detectar la unión del nanocuerpo a dicha placa de ateroma;

c) repetir las etapas a) y b) antes y después de la administración de un tratamiento a dicho sujeto;

una ausencia o una disminución de la unión del nanocuerpo en dicha placa es indicadora de un tratamiento con un efecto terapéutico.

35

Uso como medicamento

[0095] La invención se refiere además al uso de un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba para 40 la fabricación de un medicamento, en particular, un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad cardiovascular. Un método de tratamiento que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del nanocuerpo como el que se ha definido más arriba a un paciente que lo necesite, también forma parte de la presente invención.

[0096] La utilización de un ligando de VCAM-1, solo o emparejado a un agente estabilizador de las placas de 45 ateroma, permite, efectivamente, reducir la probabilidad de ruptura de las placas.

[0097] Por «tratamiento» de una enfermedad cardiovascular, se entiende el «tratamiento terapéutico» (o 50 curativo) de una enfermedad cardiovascular, que incluye la disminución o la inhibición de la evolución de una placa de aterosclerosis, en particular hacia un estado de placa de aterosclerosis vulnerable, o la regresión de una placa de aterosclerosis, en particular de una placa vulnerable. Asimismo se entiende el «tratamiento profiláctico» de una enfermedad cardiovascular que incluye particularmente la prevención de un accidente isquémico agudo.

[0098] El nanocuerpo según la invención se une ventajosamente a un agente estabilizador de las placas de 55 ateroma, de forma que pone en contacto el agente estabilizador y la lesión. La elección de un agente estabilizador apropiado está al alcance del experto en la materia. Algunos ejemplos de agentes estabilizadores incluyen, particularmente, moléculas antiinflamatorias, como los antiinflamatorios no esteroideos.

[0099] La invención se refiere más particularmente al nanocuerpo como el que se ha definido más arriba para 60 su uso en el tratamiento de la aterosclerosis y/o la prevención de un accidente isquémico agudo, preferentemente para el tratamiento de una placa aterosclerótica vulnerable.

[0100] La invención se refiere además al uso de un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba para 65 la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la aterosclerosis y/o a la prevención de un accidente isquémico agudo en un paciente susceptible de presentar una enfermedad cardiovascular.

[0101] La invención se refiere igualmente a un método de tratamiento de la aterosclerosis y/o de prevención

de un accidente isquémico agudo en un paciente que lo necesite, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba a un paciente que lo necesite.

[0102] Preferentemente, el nanocuerpo según la invención se utiliza para tratar una placa de aterosclerosis vulnerable, más preferentemente una placa de aterosclerosis coronaria o aórtica vulnerable.

[0103] Preferentemente, dicho accidente isquémico agudo se selecciona en el grupo constituido por un infarto de miocardio, un accidente vascular cerebral, una embolia renal, una isquemia aguda de un miembro, y una ruptura de aneurisma aórtico.

10

[0104] El nanocuerpo según la invención puede administrarse por ejemplo por vía oral, por inhalación, por vía parenteral (en particular por inyección intravenosa), en una forma apropiada. Cuando se elige la vía parenteral, el nanocuerpo puede estar en forma de soluciones o de suspensiones inyectables envasadas en ampollas o frascos. Las formas de administración parenteral se obtienen de forma convencional por mezcla del nanocuerpo con amortiguadores, estabilizantes, conservadores, agentes solubilizantes, agentes isotónicos y agentes de puesta en suspensión. De conformidad con las técnicas conocidas, estas mezclas pueden esterilizarse y envasarse en forma de inyecciones intravenosas. Como amortiguador, el experto en la materia podrá utilizar amortiguadores a base de sales de fosfato orgánico. Algunos ejemplos de agentes de puesta en suspensión engloban la metilcelulosa, la hidroxietilcelulosa, la hidroxipropilcelulosa, la goma arábiga, y la carmelosa de sodio. Además, los estabilizantes útiles según la invención incluyen el sulfito de sodio y el metabisulfito de sodio, mientras que se puede citar el p-hidroxibenzoato de sodio, el ácido sórbico, el cresol y el clorocresol como conservadores.

15

20

[0105] La cantidad de nanocuerpos administrada depende naturalmente del modo de administración, del tamaño y/o del peso del paciente y de la naturaleza del agente citotóxico que puede asociarsele.

25

[0106] La presente invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica que contiene dicho nanocuerpo como el que se ha definido más arriba asociada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

[0107] El término «farmacéuticamente» o «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones secundarias, alérgicas o no deseadas de otra forma cuando se administran a un mamífero, en particular a un humano.

35

[0108] En el contexto de la invención, la expresión «vehículo farmacéuticamente aceptable» incluye cualquier solvente, medio de dispersión, revestimiento, agente bacteriano o antifúngico, agente isotónico o retardante de la absorción, y análogos. El experto en la materia conoce el uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas. Con excepción del caso en el que el medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se baraja su uso en las composiciones farmacéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios a las composiciones.

40

Uso para detectar in vitro VCAM-1

[0109] La presente invención también se refiere al uso de un nanocuerpo como el que se ha definido más arriba para la detección *in vitro* de VCAM-1 en una muestra.

45

[0110] Por «muestra» se entiende aquí una parte de un elemento más grande. Preferentemente, la muestra es una sustancia de origen biológico. Algunos ejemplos de muestras biológicas incluyen, sin limitarse, partes de órganos o de tejidos como el riñón, el hígado, el corazón, el pulmón, etc., las arterias, las venas, etc., la sangre y sus compuestos como el plasma, las plaquetas, las subpoblaciones de células sanguíneas, etc.

50

[0111] La presente invención se ilustrará más detalladamente con las figuras y ejemplos que aparecen a continuación.

Descripción de las figuras

55

[0112]

La **Figura 1** presenta el análisis en citometría de flujo de los nanocuerpos anti-VCAM-1 (cAbVCAM1-1: 1; cAbVCAM1-2: 2; cAbVCAM1-3: 3; cAbVCAM1-4: 4; cAbVCAM1-5: 5; cAbVCAM1-6: 6; cAbVCAM1-7: 7; cAbVCAM1-8: 8; cAbVCAM1-9: 9 y cAbVCAM1-10: 10) en células de ratón bEND5 no tratadas (línea de puntos) o tratadas con TNF α (línea continua). Un anticuerpo monoclonal anti-VCAM-1 de ratón marcado con PE (Ct +) se ha utilizado como control positivo y el nanocuerpo cAbBcl110 (Ct -) se ha utilizado como control negativo.

60

La **Figura 2** representa histogramas que muestran la unión normalizada de los nanocuerpos anti-VCAM-1 (cAbVCAM1-1: 1; cAbVCAM1-2: 2; cAbVCAM1-3: 3; cAbVCAM1-4: 4; cAbVCAM1-5: 5; cAbVCAM1-6: 6; cAbVCAM1-7: 7; cAbVCAM1-8: 8; cAbVCAM1-9: 9 y cAbVCAM1-10: 10) marcados con ^{99m}Tc en células bEND5 no tratadas (barras blancas), tratadas con TNF α (y expresando por tanto VCAM-1; barras negras) o tratadas con TNF α

65

e incubadas con un exceso de nanocuerpo anti-VCAM-1 no marcado (barras grises). *: $P < 0,05$ frente a $^{99m}\text{TcAbBcll10}$. †: $P < 0,05$ frente a tratadas con $\text{TNF}\alpha$ e incubadas con un exceso de nanocuerpos anti-VCAM-1 no marcado.

5 La **Figura 3** muestra los resultados de inmunohistoquímica en muestras de corazón (C), músculo (M), glándula salivar (GS), de tejidos linfáticos que incluyen muestras de médula ósea (MO), ganglio linfático (GL), bazo (B) y timo (T), y muestras de aorta (A) de ratón de control C57Bl/6J y de ratón $\text{ApoE}^{-/-}$ marcados con un nanocuerpo anti-VCAM-1 (VCAM-1). La especificidad de los resultados se muestra por la ausencia de marcado en ausencia de anticuerpo primario (ct). La barra de escala representa 20 μm , excepto para la aorta (A) donde representa 100 μm .

10

La **Figura 4** representa histogramas que muestran la absorción aórtica (en %ID/g) del nanocuerpo cAbVCAM1-5 y del nanocuerpo de control cAbBcll10 en la aorta de ratones de control C57Bl/6J (barras blancas) y los segmentos arteriales de ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ ordenados según el índice de extensión de la lesión (+++: barras negras; ++: barras con rayas diagonales; + barras con rayas verticales; - barras con puntos). Los resultados se expresan en media \pm error estandar de la media. *: $P < 0,05$ frente a C57Bl/6J. †: $P < 0,05$ frente al índice de extensión de la lesión siguiente.

15

La **Figura 5** representa histogramas que muestran la proporción de la lesión sobre el control obtenida con el nanocuerpo cAbVCAM1-5 y el nanocuerpo de control cAbBcll10 por cuantificación de los autorradiogramas: *: $P < 0,05$ frente a cAbBcll10. EN la parte superior derecha de la figura se presentan autorradiogramas representativos (ARG) obtenidos con $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ y $^{99m}\text{Tc-cAbBcll10}$ en cortes adyacentes, en los que VCAM-1 además ha sido inmunomarcado (VCAM-1). La barra de escala representa 200 μm .

20

La **Figura 6** representa perfiles HPLC del nanocuerpo $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ que muestran que el nanocuerpo es estable *in vitro* 0 hora (A) y 6 horas (B) después del radiomarcado, así como en *in vivo* en la sangre 3 horas después de la inyección (C).

25

La **Figura 7** representa las imágenes de proyecciones de intensidad máxima (MIP) de los nanocuerpos de control $^{99m}\text{TcAbBcll10}$ (A) y $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (B) obtenidos en cuerpo entero por SPECT/CT *in vivo* 3 horas después de la inyección intravenosa en ratones C57Bl/6J. Se indican la vesícula (V), los riñones (Ri), los ganglios linfáticos (GL), la médula ósea (MO), el timo (T) y el bazo (B).

30

La **Figura 8** representa vistas coronarias representativas por gammagrafía CT, SPECT y fusión SPECT/CT *in vivo*, tomadas en el cayado aórtico de ratones C57Bl/6J, 3 horas después de la inyección de nanocuerpo $^{99m}\text{Tc-cAbBcll10}$ (cAbBcll10) o de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (cAbVCAM1-5). La escala de imágenes SPECT se ha ajustado del 1 al 3,4 % de la dosis inyectada de forma que permita una comparación directa. Los ganglios linfáticos auxiliares (In) y el timo (t) se indican en las imágenes SPECT/CT. L representa la izquierda, R representa la derecha, P representa la cara posterior.

35

La **Figura 9** representa vistas coronarias representativas en gammagrafía CT, SPECT y fusión SPECT/CT *in vivo*, tomadas en el cayado aórtico de ratones $\text{ApoE}^{-/-}$, 3 horas después de la inyección de nanocuerpo $^{99m}\text{Tc-cAbBcll10}$ (cAbBcll10) o de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (cAbVCAM1-5). La escala de imágenes SPECT se ha ajustado del 1 al 3,4 % de la dosis inyectada de forma que permita una comparación directa. Los ganglios linfáticos auxiliares (In), el timo (t) y el cayado aórtico (ao) se indican en las imágenes SPECT/CT. La flecha indica el cayado aórtico en la imagen SPECT. L representa la izquierda, R representa la derecha, P representa la cara posterior.

40

45 La **Figura 10** representa histogramas que muestran las proporciones *in vivo* cayado/sangre (panel de la izquierda) y cayado/corazón (panel de la derecha) obtenidos en ratones de control C57Bl/6J (barras blancas) o ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ (barras negras) después de la administración de nanocuerpos de control cAbBcll10 o de nanocuerpos cAbVCAM1-5, en base a cuantificaciones de imágenes SPECT. *: $P < 0,05$ frente a $^{99m}\text{Tc-cAbBcll10}$. †: $P < 0,05$ frente a C57Bl/6J.

50 La **Figura 11** representa el análisis por citometría de flujo de los nanocuerpos anti-VCAM-1 (cAbVCAM1-1: 1; cAbVCAM1-2: 2; cAbVCAM1-3: 3; cAbVCAM1-4: 4; cAbVCAM1-5: 5; cAbVCAM1-6: 6; cAbVCAM1-7: 7; cAbVCAM1-8: 8; cAbVCAM1-9: 9 y cAbVCAM1-10: 10) (línea de puntos) en células de hámster CHO no transfectadas (A) o transfectadas (B) con un plásmido codificante para el VCAM-1 de conejo. Una condición sin nanocuerpo se ha utilizado como control negativo (línea continua). Los nanocuerpos cAbVCAM1-1 y cAbVCAM1-5 se fijan a las células CHO expresando el VCAM-1 de conejo.

55

Ejemplo

[0113] El ejemplo que aparece a continuación muestra las propiedades específicas de los nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9 según la invención respecto de otros nanocuerpos anti-VCAM-1.

60

Material y métodos

65 *Generación y producción de nanocuerpos*

[0114] Los nanocuerpos que se dirigen a VCAM-1 se han generado, de forma general, según los métodos anteriormente publicados (Arbabi Ghahroudi et al. (1997) FEBS Lett. 414:521-526). Más específicamente, se ha inmunizado un dromedario con proteínas VCAM-1 recombinantes a la vez humanas y murinas (RnD Systems, Minneapolis, USA). Los linfocitos de la sangre se han aislado y el ARN se ha purificado. Los dominios variables de los nanocuerpos monocatenario (VHH o nanocuerpo) se han amplificado utilizando la técnica de la RT-PCR de dos etapas y se han clonado en fase con la proteína 3 del bacteriófago M13. Los nanocuerpos se han sometido a la expresión de fagos y se han utilizado en biopanning sobre inmunógenos inmovilizados. Se han utilizado extractos bacterianos totales que contienen nanocuerpos solubles para seleccionar ligandos de VCAM-1 individuales en base a una señal positiva en ELISA y en citometría de flujo en células bEND5 estimuladas con TNF α . Después de la secuenciación, los nanocuerpos anti-VCAM-1 seleccionados y los nanocuerpos de control cAbBclI10 no pertinentes se han producido en forma de proteínas marcadas con una hexahistidina en *E. coli* y purificadas como se describe en Saerens et al. (2005) J. Mol. Biol. 352:597-607.

Evaluación in vitro de nanocuerpos no marcados

15 **[0115]** *Estirpe celular* - La estirpe celular endotelial de ratón bEND5 (ECACC, Salisbury, GB) se ha cultivado en un medio DMEM complementado. La expresión de VCAM-1 se ha inducido por estimulación con 10 ng/mL de TNF α durante 18 horas.

20 **[0116]** *Citometría de flujo* - 10⁵ células bEND5 estimuladas con TNF α y no estimuladas se han incubado bien con 200 ng de anticuerpo monoclonal anti-VCAM-1 de ratón marcado con PE (mAb; Abcam), bien secuencialmente con 1 μ g de nanocuerpo, 1 μ g de anticuerpo monoclonal anti-His-tag (Serotec) y 200 ng de IgG1 de rata anti-ratón (BD Biosciences). El enlace se ha medido en un FACS Canto II analyzer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), y los datos se han analizado con el programa FlowJo (TreeStar, Ashland, USA).

25 **[0117]** *Estabilidad térmica* - Los valores de T_m (temperaturas de despliegue) se han obtenido en un espectropolarímetro J-715 (Jasco, Easton, MD, USA) como se describe en Vaneycken et al. (2010) J. Nucl. Med. 51:1099-1106.

30 **[0118]** *Evaluación de la afinidad basada en la resonancia plasmónica de superficie (SPR)* - La afinidad de los nanocuerpos para VCAM-1 recombinante humano o murino se ha determinado por análisis SPR sobre un dispositivo Biacore 3000. ICAM-1 de ratón recombinante (RnD Systems) se ha utilizado como control negativo. Las proteínas recombinantes se han inmovilizado sobre un chip sensor CM5 (Biacore, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Se han ensayado diluciones de la mitad en serie de nanocuerpos de 50 a 1 nM en PBS 0,005 % Tween 20®. Se han determinado las constantes de afinidad utilizando un ajuste del modelo de asociación estándar 1:1 (software BIAevaluation).

35 **[0119]** *Competición con el epítipo utilizando la SPR* - La SPR se ha utilizado para determinar qué nanocuerpos estaban en competición para el mismo epítipo. Los procedimientos utilizados son idénticos a los descritos en Vaneycken et al. (2011) FASEB J. 25:2433-2446.

Radiomarcado y determinación por HPLC de la estabilidad in vitro e in vivo

45 **[0120]** Los nanocuerpos se han radiomarcado con ^{99m}Tc utilizando el método tricarbonilo como se describe en Gainkam et al. (2008) J. Nucl. Med. 49:788-795. La pureza radioquímica se ha evaluado inmediatamente después del marcado, tras 6 horas a 20°C en PBS y en sangre de ratón 3 h después de la inyección (p.i.). En el último caso, 100 mL de sangre total muestreada se han centrifugado y el plasma se ha filtrado utilizando una membrana Nanosep 10K Omega. La pureza radioquímica se ha determinado por RP-HPLC utilizando una columna C4 eluida con una fase móvil en gradiente ACN/TFA. La radioactividad se ha visualizado utilizando un radiodetector 50 (γ-RAM Model 4, LabLogic).

Evaluación in vitro de los nanocuerpos marcados con ^{99m}Tc

55 **[0121]** 250x10³ células bEND5 se han cultivado en placas de 24 pocillos y se han estimulado durante 18 horas con TNF α a 10 ng/mL. 5 nM de cada nanocuerpo-^{99m}Tc se han incubado en 0,5 mL de PBS + 1 % de seroalbúmina humana (HSA) durante 1,5 horas a 37°C. Se han realizado estudios de competición con un exceso de 500 veces de nanocuerpo no marcado para determinar la especificidad de unión. Después del lavado, los ^{99m}Tc-nanocuerpos unidos se han recogido y contado en un contador gamma (Cobra II Inspector 5003, Canberra Packard, USA). Los experimentos se han realizado por triplicado. Se ha extraído la unión no específica de los pozos, y los resultados se han normalizado con la condición TNF α -negativa.

Modelo animal y procesado de las aortas

65 **[0122]** Todos los experimentos con animales han sido aprobados por el comité del Centro de Investigación del Servicio de Salud del Ejército de Grenoble (Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de Grenoble, CRSSA). Se han utilizado ratones hembras de control y ApoE^{-/-} de 3161 semanas (Charles-River, Francia). Los

ratones ApoE^{-/-} (n=37) se han alimentado con un régimen occidental con un contenido del 0,25 % de colesterol (Safe, Francia) mientras que los ratones C57Bl/6J de control (n=9) se han alimentado con un régimen alimenticio estándar. Cada nanocuerpo anti-VCAM-1 se ha evaluado en 3 ratones salvo el ApoE^{-/-} nanocuerpo cAbVCAM1-5 (n=6), que además se ha evaluado en ratones C57Bl/6J de control (n=4). Los anticuerpos cAbBcl110 se han evaluado como control negativo a la vez en los ratones ApoE^{-/-} (n=4) y los ratones de control (n=5). Dos horas después de la administración de nanocuerpos radiomarcados con ^{99m}Tc (6764 MBq i.v.), los ratones han sido anestesiados utilizando isoflurano 2 % (Baxter) y se ha realizado la adquisición SPECT/CT (nanoSPECT, Bioscan, ver más abajo). Se ha sacrificado a los animales con una sobredosis de pentobarbital de sodio (CEVA) y las aortas así como los otros órganos importantes se han extraído con precaución. Las aortas se han separado de los tejidos adherentes en una solución de formalina al 10 % y cortadas en 12 segmentos desde la aorta ascendente hasta la bifurcación ilíaca. Se ha atribuido un índice de extensión de la lesión a cada segmento de la siguiente manera: (-) sin lesión (segmentos de control), (+) lesiones que cubran hasta el 50 % de la longitud del segmento arterial, (++) lesiones que cubran más del 50 % de la longitud del segmento arterial y (+++) lesiones que se extienden en toda la longitud del segmento. Los segmentos aórticos y las muestras de tejido se han pesado y su actividad se ha determinado con un contador de pozo de gamma (Cobra II, Packard). Se ha corregido el ruido de fondo y el decrecimiento radioactivo de los resultados y se han expresado en porcentajes de la dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g). Las absorciones de las lesiones aórticas y del control se han definido como la absorción media en todos los segmentos clasificados (+++) o (-) respectivamente. También se han determinado las proporciones lesión/control, lesión/sangre y lesión/corazón.

[0123] Se han obtenido criosecciones adyacentes de 20 y 8 mm de grosor a partir de los 12 segmentos aórticos obtenidos para la formación de imágenes por micro-autorradiografía (BASS-5000, Fujifilm) y el marcado inmunohistológico de VCAM-1 respectivamente.

[0124] Además, la depuración sanguínea de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 se ha evaluado en 3 ratones C57Bl/6 por recuperación de muestras sanguíneas en diferentes momentos tras la inyección. Los resultados se han expresado en %ID en el volumen de sangre total (%ID/TBV).

Inmunohistoquímica

[0125] Tras 1 hora de bloqueo a 20°C con el 10 % de suero de asno, un anticuerpo primario de cabra anti-VCAM-1 (Santa-Cruz Biotechnology, 0,5 mg/ml) se ha aplicado en las secciones aórticas durante la noche a 4°C. Un anticuerpo secundario biotinilado de asno anti-cabra (Jackson ImmunoResearch) se ha incubado durante 1 hora a 20°C y el DAB se ha utilizado como cromógeno. Las secciones se han contracolorado con hematoxilina. La especificidad de marcado se ha verificado omitiendo el anticuerpo primario en cortes de control. En un subgrupo de ratones de control y ApoE^{-/-}, el inmunomarcado VCAM-1 se ha realizado en el corazón, el músculo, las glándulas salivares, la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y el timo.

[0126] Dos horas después de las inyecciones intravenosas, los animales anestesiados se han colocado en un lecho a temperatura controlada y se han realizado las adquisiciones SPECT/CT cuerpo entero (nanoSPECT, Bioscan). El tiempo de adquisición CT aproximado fue de 10 min, utilizando los parámetros de adquisición siguientes: 45kvp, 240 proyecciones y 1000 ms por proyección. La adquisición SPECT helicoidal se ha realizado con 4 cabezas equipadas con colimadores estenopeicos con multiagujeros de resolución de 1 mm (9 x 1,4 mm de diámetro de agujero por cabeza) utilizando 24 proyecciones y 45 minutos de adquisición. Las adquisiciones CT y SPECT se han reconstruido, fusionado y cuantificado utilizando el programa dedicado (InVivoScope). Se han dibujado las regiones de interés (ROIs) en el cayado aórtico, en la cavidad ventricular izquierda y en la pared ventricular izquierda para determinar las proporciones cayado/sangre y cayado/corazón.

Autorradiografía

[0127] Para cada animal se han obtenido imágenes autorradiográficas tras una noche de exposición de 3 grupos de cortes de 20 µm de grosor obtenidos a diferentes niveles de los 12 segmentos aórticos. Las imágenes se han cuantificado utilizando el programa dedicado (Image Gauger, Fujifilm). Las ROI se ha dibujado alrededor de las lesiones ateroscleróticas y de la pared aórtica VCAM-1 negativa control. Se ha corregido el ruido de fondo de los resultados que se han expresado en forma de proporciones lesión/control medias.

Evaluación de la reactividad de los nanocuerpos no radiomarcados contra el VCAM-1 de conejo.

[0128] Se han incubado secuencialmente 10⁵ células transfectadas o no de forma transitoria con un plásmido codificante para el VCAM-1 de conejo con 1 µg de nanocuerpo, 1 µg de anticuerpo monoclonal anti-His-tag (Serotec) y 200 ng de IgG1 de rata anti-ratón (BD Biosciences). La unión se ha medido en un FACS Canto II analyzer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), y los datos se han analizado con el programa FlowJo (TreeStar, Ashland, USA). Se ha realizado un control negativo omitiendo el nanocuerpo.

65 *Análisis estadístico*

[0129] Todos los resultados se presentan en forma de media \pm error estándar de la media. Los ensayos no paramétricos de Mann&Witney U y de Wilcoxon se han utilizado para comparar los datos emparejados y no emparejados. Las diferencias se han considerado como significativas para $p < 0,05$.

Resultados:

5

Generación de los nanocuerpos anti-VCAM

[0130] Los inventores han querido desarrollar nanocuerpos con reacción cruzada para VCAM-1 humano y murino. Por consiguiente, los nanocuerpos se han generado por inmunización de un dromedario con proteínas recombinantes VCAM-1 a la vez humanas y murinas, y por biopanning de la biblioteca de nanocuerpos inmunes obtenidos por expresión de fagos. Se han tamizado en ELISA extractos bacterianos totales que contienen los nanocuerpos individuales para unirlos con las proteínas recombinantes VCAM-1 y en citometría de flujo para unirlos con las células bEND5 expresando VCAM-1.

15 **[0131]** Después de la secuenciación, 31 nanocuerpos anti-VCAM-1 se han identificado y reagrupado en 12 familias en base a la similaridad de las secuencias en los bucles de unión en el antígeno. Seis familias de nanocuerpos eran específicas de VCAM-1 murino (mVCAM-1) y 6 familias se unían a la vez con VCAM-1 murino y humano (hVCAM-1). En base a las señales ELISA y de citometría de flujo de los extractos totales, 10 nanocuerpos (llamados cAbVCAM1-1 a -10) se han seleccionado para ser analizados más detalladamente. El rendimiento de
20 producción de nanocuerpo era de 0,5 a 10,5 mg/L de cultivo bacteriano (**Tabla 4**).

Caracterizaciones in vitro

[0132] Las experiencias de citometría de flujo sobre las células bEND5 han mostrado que los 10 nanocuerpos
25 seleccionados interactuaban con VCAM-1 (**Figura 1**). Como se ha demostrado con los análisis SPR, resumidos en la **Tabla 4**, todos los nanocuerpos seleccionados se unían a VCAM-1 con altas afinidades que oscilaban entre 0,2 a 45,7 nM. Además, entre los 10 nanocuerpos seleccionados, 6 eran de reactividad cruzada con hVCAM-1 con afinidades que se mantenían en el orden del nanomolar (**Tabla 4**). Estos seis nanocuerpos fueron cAbVCAM1-1, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-8, cAbVCAM1-9 y cAbVCAM1-10. En base a los estudios de competición
30 SPR, los nanocuerpos cAbVCAM1 se han agrupado en 3 categorías de selección de epítipo: cAbVCAM1-1/5, cAbVCAM1-2/3/6/7/9/10 y cAbVCAM1-4/8. Todos los nanocuerpos han mostrado una fuerte estabilidad térmica, como han demostrado las temperaturas de despliegue que van de 59,4 a más de 87°C (**Tabla 4**).

Tabla 4: Comparación entre los 10 nanocuerpos anti-VCAM-1 evaluados.

Radiomarcador	%ID/g de lesión	Lesión/Control	Lesión/Sangre	Lesión/Corazón	K _D mVCAM-1 (nM)	K _D hVCAM1 (nM)	Rendimiento de producción (mg/L)	T _m (°C)
cAbVCAM1-1	0,87±0,08 #9	2,15±0,20 #9	0,74±0,10* #10	2,65±0,23* #9	8,3±1,2 #7	12,4±0,5 #5	2,0 #7	72,3±0,1 #2
cAbVCAM1-2	2,15±0,29* #6	2,90±0,45 #2	3,37±0,32* #5	5,55±0,58* #7	0,3±0,0 #2	Sin reactividad cruzada	5,0 #5	62,3±0,1 #6
cAbVCAM1-3	2,95±0,16* #2	4,07±0,56 #3	5,06±0,39* #1	7,40±0,91* #3	2,4±0,1 #5	9,1±0,9 #4	6,8 #3	59,7±0,1 #9
cAbVCAM1-4	2,21±0,59* #5	3,20±0,74 #9	1,14±0,29 #9	1,96±0,56* #10	0,2±0,0 #1	Sin reactividad cruzada	6,8 #3	59,4±0,1 #10
cAbVCAM1-5	2,53±0,08* #3	4,95±0,85* #1	4,32±0,48* #2	8,30±1,11* #1	2,0±0,0 #4	6,5±0,7 #3	10,5 #1	>87 #1
cAbVCAM1-6	0,73±0,08 #10	4,57±0,93* #2	1,85±0,37 #8	4,98±0,75 #8	5,2±0,6 #6	Sin reactividad cruzada	3,0 #6	72,0±0,1 #3
cAbVCAM1-7	1,27±0,25* #8	2,88±0,65 #7	4,02±1,05* #3	5,98±0,96 #4	26,6±1,2 #9	Sin reactividad cruzada	6,9 #2	60,9±0,3 #8
cAbVCAM1-8	2,48±0,46* #4	1,40±0,10 #10	3,66±0,10* #4	7,71±0,38* #2	13,2±0,3 #8	1,4±0,5 #1	1,5 #8	61,5±0,1 #7
cAbVCAM1-9	2,99±0,07* #1	2,19±0,60 #8	2,51±0,03* #6	5,69±0,36* #6	0,9±0,2 #3	5,3±0,7 #2	0,9 #9	66,8±0,2 #4
cAbVCAM1-10	1,93±0,14* #7	3,47±0,67* #4	2,01±0,14* #7	5,76±0,56* #5	45,7±20,0 #10	18,4±7,0 #6	0,8 #10	63,4±0,2 #5
cAbBcll10	0,68±0,60	1,66±0,28	1,57±0,09	4,00±0,14	-	-	-	-

La media ± error estándar de la media y el rango (#) se dan para los parámetros obtenidos bien *ex vivo* por conteo-pozo gamma (%ID/g de lesión, proporción lesión/control, proporción lesión/sangre, proporción lesión/corazón), o *in vitro*, (K_D para mVCAM-1 o hVCAM-1, rendimiento de producción y T_m). * p<0,05 frente a cAbBcll10.

[0133] Tras las etapas de radiomarcado con ^{99m}Tc y de purificación, las purezas radioquímicas eran superiores al 95 % para los 10 nanocuerpos cAbVCAM1 y el nanocuerpo de control cAbBcll10. El marcado con ^{99m}Tc no ha afectado el reconocimiento de VCAM-1 en la mayor parte de los ligandos, como se ha demostrado con el ensayo de unión *in vitro* sobre las células bEND (Figura 2): los inventores han demostrado, por tanto, que la unión en las células endoteliales VCAM-1 positivas y estimuladas con TNF α era significativamente más fuerte que en las células estimuladas. Además, la unión en las células estimuladas con TNF α se inhibió con éxito por competición con un exceso de nanocuerpo no marcado, lo que demostró su especificidad.

Análisis de las biodistribuciones

10

[0134] Las biodistribuciones de los nanocuerpos marcados con ^{99m}Tc en los ratones ApoE $^{-/-}$ se han resumido en la Tabla 5. Todos los nanocuerpos, incluido el de control cAbBcll10, han mostrado una fuerte absorción en los riñones, entre 97 ± 16 y 315 ± 33 %ID/g y fuertes actividades en la vejiga. De forma interesante, las absorciones de ^{99m}Tc cAbVCAM1 eran elevadas en los tejidos linfáticos e incluso alcanzaron una diferencia estadística para ^{99m}Tc cAbVCAM1-3 (bazo y timo), ^{99m}Tc -cAbVCAM1-4/5 (bazo, timo y médula ósea) y ^{99m}Tc -cAbVCAM1-9 (timo) ($p < 0,05$ frente a ^{99m}Tc -cAbBcll10). Con excepción de los pulmones y del hígado (absorción media de $2,5\pm 0,8$ y $2,7\pm 0,9$ %ID/g, respectivamente), la absorción fue inferior a 2 %ID/g en los otros tejidos estudiados, incluidos la sangre y el miocardio.

15

[0135] Como se muestra en la **Tabla 4**, la absorción en las lesiones ateroscleróticas era superior a 2 %ID/g para 6 de los 10 nanocuerpos cAbVCAM1, con un valor máximo de $2,99\pm 0,14$ %ID/g para ^{99m}Tc -cAbVCAM1-9 ($P < 0,05$ frente a ^{99m}Tc -cAbBcll10).

20

[0136] Las proporciones lesión/control, lesión/sangre y lesión/corazón se han determinado a partir de los datos de biodistribución (**Tabla 4**). La proporción lesión/control fue superior a 2 en todos los nanocuerpos cAbVCAM1 evaluados excepto uno, con una relación máxima de $4,95\pm 0,85$ para cAbVCAM1-5 ($P < 0,05$ frente a ^{99m}Tc cAbBcll10). La proporción lesión/sangre fue superior a 1 en todos los nanocuerpos cAbVCAM1 evaluados excepto uno, con una relación máxima de $5,6\pm 0,39$ para ^{99m}Tc -cAbVCAM1-3 ($P < 0,05$ frente a ^{99m}Tc -cAbBcll10). Por último, la proporción lesión/corazón fue superior a 1 en todos los nanocuerpos, con un valor máximo de $8,30\pm 1,11$ para ^{99m}Tc cAbVCAM1-5 ($P < 0,05$ frente a ^{99m}Tc -cAbBcll10).

25

30

Tabla 5: Biodistribución ex vivo de los nanocuerpos anti-VCAM-1 marcados con ^{99m}Tc 3 horas después de la inyección en ratones de control hipercolesterolémicos ApoE^{-/-}.

	ApoE ^{-/-}										
	cAbVCAM1-1										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	cAbBcl10
Sangre	1,2±0,1*	0,6±0,1	0,6±0,0	1,5±0,1*	0,6±0,1	0,4±0,1	0,3±0,0	0,6±0,1	1,2±0,0*	1,0±0,2*	0,4±0,0
Corazón	0,3±0,0	0,4±0,1*	0,4±0,0*	1,1±0,0*	0,3±0,1*	0,2±0,0	0,2±0,0	0,3±0,1	0,5±0,0*	0,4±0,1	0,2±0,0
Pulmón	3,2±0,6	1,5±0,2	3,2±0,5	4,1±1,0*	2,3±0,3*	1,7±1,1	1,3±0,2	2,1±0,6	2,5±0,1	2,07±1,0	1,0±0,2
Hígado	2,2±0,24*	2,0±0,1	1,5±0,1	8,3±0,7*	1,8±0,3*	0,8±0,1	1,2±0,2	3,1±0,3*	2,4±0,2*	4,0±0,4*	0,7±0,0
Musculo esquelético	0,6±0,4	0,1±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,1	0,1±0,0	0,2±0,1	0,2±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0
Piel	0,2±0,1	0,3±0,1	0,3±0,0	0,9±0,5	0,4±0,0	0,3±0,0	0,4±0,0	0,6±0,2	0,4±0,1	0,4±0,1	0,3±0,0
Grasa	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0*	0,1±0,0	0,1±0,0	0,2±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0*	0,1±0,0
Cerebro	0,0±0,0*	0,1±0,0*	0,1±0,0*	0,2±0,0	0,1±0,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0
Glándulas salivares	0,9±0,3*	0,4±0,0	0,5±0,0	1,2±0,1*	0,5±0,1*	0,3±0,0	0,5±0,1	0,6±0,3	0,6±0,1	0,7±0,1	0,2±0,0
Páncreas	0,3±0,1	0,2±0,0	0,3±0,0	0,6±0,0*	0,3±0,0*	0,2±0,0	0,2±0,0	0,3±0,1	0,4±0,0*	0,3±0,1	0,1±0,0
Tiroides	0,9±0,2	0,5±0,2	1,0±0,2	1,5±0,2	0,7±0,1	1,0±0,6	0,9±0,2	1,1±0,4	1,3±0,5	1,4±0,1	0,1±0,0
Estómago	0,6±0,0	0,6±0,1	0,6±0,0	1,5±0,3*	0,6±0,1*	0,3±0,0	0,5±0,1	0,7±0,1	0,7±0,0	0,7±0,1	0,4±0,1
Bilis	0,9±0,2	0,4±0,1	1,7±1,0	0,5±0,0	0,7±0,2	0,5±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1	---	0,8±0,2	0,4±0,1
Intestino	1,4±0,8	0,5±0,1	0,5±0,0	0,7±0,4*	0,5±0,1*	0,3±0,1	0,6±0,0	0,5±0,1	0,6±0,0	0,5±0,1	0,2±0,1
Riñón	125±13	228±34	303±68	97±16*	222±12	207±31	254±18	315±33	158±6	304±32	266±14
Orina	265±84*	59±14	96±35	58±33	83±15	77±18	92±25	27±7	98±12	44±14	41±10
Bazo	2,9±0,2	8,0±0,3	20,3±11,4*	35,7±0,3*	9,2±1,0*	1,7±0,0	1,6±0,1	1,6±0,2	8,0±1,2	4,3±0,5	0,4±0,0
Tímo	0,4±0,1	0,7±0,1	1,9±0,1*	2,2±0,6*	1,7±0,1*	0,4±0,0	0,5±0,0	0,5±0,1	1,5±0,2*	0,3±0,2	0,2±0,0
Médula ósea	2,6±0,3	5,9±0,8	13,7±5,6	31,8±2,2*	10,7±2,9*	1,9±0,2	2,6±0,1	1,5±0,3	7,0±0,8	3,2±0,7	1,0±0,7

Los resultados se expresan en media ± error estándar de la media. *: p<0,05 frente a cAbBcl10.

Inmunohistoquímica

[0137] Como se muestra en la **Figura 3**, una expresión constitutiva de VCAM-1 ha sido observada en los tejido linfoides (es decir, la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y el timo) a la vez en los ratones de control C57Bl/6J y los ratones hipercolesterolémicos ApoE^{-/-}, mientras que no se ha encontrado ninguna expresión de VCAM-1 en el corazón, los músculos y las glándulas salivares. Además, se ha observado un fuerte marcado VCAM-1 en las lesiones aórticas, a nivel del endotelio, así como en el interior de la placa aterosclerótica, pero no en la aorta de los ratones de control C57Bl/6J.

10 *Absorción de cAbVCAM1-5 en las lesiones ateroscleróticas: formación de imagen ex vivo e in vivo*

[0138] En base a los criterios de selección resumidos en la *Tabla 4*, los nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9 han sido considerados por los inventores como los más promotores para servir como radiomarcadores en la formación de imagen médica. El nanocuerpo cAbVCAM1-5 ha sido más particularmente seleccionado para ser objeto de evaluaciones adicionales.

[0139] *Absorción aórtica* - En los ratones ApoE^{-/-}, los inventores han demostrado que la absorción aórtica de ^{99m}TccAbVCAM1-5 concordaba con el índice de extensión de la lesión. Efectivamente, la absorción de ^{99m}TccAbVCAM1-5 ha aumentado al mismo tiempo que el volumen relativo de la lesión aterosclerótica, mientras que dicho gradiente no se ha observado con ^{99m}Tc-cAbBcll10 (**Figura 4**). Además la absorción de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 en la aorta ha sido caracterizada por autorradiografía. Como se muestra en la **Figura 5**, ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 se acumula a nivel de las lesiones ateroscleróticas positivas a VCAM-1 conllevando una relación lesión-control de 8,7±0,5 (P<0,05 frente a cAbBcll10).

25 **[0140]** *Estabilidad* - Los inventores han demostrado por HPLC que ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 era estable *in vitro* hasta 6 horas después del radiomarcado, e *in vivo* en la sangre 3 horas después de la inyección, en el momento de la realización de la tomografía SPECT (**Figura 6**).

[0141] *Biodistribución en los ratones de control* - ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 se ha eliminado rápidamente de la circulación, y se ha identificado claramente una absorción en los riñones, la vejiga y los tejidos linfáticos en las imágenes SPECT *in vivo* a la vez en los ratones de control C57Bl/6J y los ratones ApoE^{-/-} ateroscleróticos, mientras que solo los riñones y la vejiga eran visibles tras la inyección de ^{99m}Tc-cAbBcll10 (**Figura 7**). Además, se ha confirmado *ex vivo* la absorción de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 en los tejidos linfáticos de los ratones de control C57Bl/6J con análisis de biodistribución (**Tabla 6**).

35 **Tabla 6:** Biodistribución *ex vivo* de los nanocuerpos cAbVCAM1-5 y cAbBcll10 marcados con ^{99m}Tc 3 horas después de la inyección a ratones de control C57Bl/6J.

	C57Bl/6J	
	cAbVCAM1-5	cAbBcll10
Sangre	0,5±0,1	0,4±0,0
Corazón	0,2±0,0*	0,1±0,0
Pulmón	1,7±0,2*	0,8±0,2
Hígado	1,4±0,2	1,0±0,1
Músculo esquelético	0,1±0,0	0,1±0,0
Piel	0,4±0,0	0,4±0,0
Grasa	0,2±0,0	0,1±0,0
Cerebro	0,0±0,0*	0,0±0,0
Glándulas salivares	0,5±0,0*	0,3±0,0
Páncreas	0,2±0,0*	0,2±0,0
Tiroides	0,7±0,1	0,5±0,1
Estómago	0,5±0,0*	0,4±0,0
Bilis	0,3±0,0	0,5±0,1
Intestino	0,5±0,1	0,3±0,0
Riñón	287±43	350±16
Orina	59±23	47±8
Bazo	7,4±0,2*	0,3±0,0
Timo	1,5±0,1*	0,1±0,0

Médula ósea	7,9±2,0*	0,4±0,0
Los resultados se presentan en media ± error estándar de la media. *: P<0,05 frente a cAbBcll10.		

Efectivamente, los inventores han demostrado que la absorción de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 representaba 7,4±0,2, 1,5±0,1 y 7,9±2,0 %ID/g en el bazo, el timo y la médula ósea, respectivamente (P<0,05 frente a ^{99m}Tc-cAbBcll10 en los tres tejidos).

5

[0142] *Tomografía PECT/CT* - Tras el diagnóstico por tomografía SPECT/CT la absorción de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 se ha visualizado en las lesiones ateroscleróticas del cayado aórtico de ratón ApoE^{-/-}, mientras que no se ha observado ninguna absorción de marcador en el mismo lugar en los animales C57Bl/6J (**Figuras 8 y 9**). Por consiguiente, las proporciones cayado/sangre y cayado/corazón se han revelado significativamente más elevadas en los ratones ApoE^{-/-} respecto de los ratones C57Bl/6J y respecto del nanocuerpo de control negativo (P<0,05; **Figura 10**).

10

10)

[0143] *Reactividad de los nanocuerpos no radiomarcados contra el VCAM-1 de conejo* - Los inventores han demostrado por citometría de flujo que cAbVCAM1-1 y cAbVCAM1-5 se unían específicamente al VCAM-1 de conejo (**Figura 11**).

15

Debate

[0144] Este estudio ha sido preparado por los inventores para generar nanocuerpos que reconozcan a la vez los homólogos VCAM-1 humano y murino, en la medida en que dichos ligandos de reactividad cruzada son particularmente interesantes para trasladar a la práctica clínica los resultados validados en modelos animales bien caracterizados. Diez nanocuerpos anti-VCAM-1 se han generado y producido con afinidades para los homólogos murino y/o humano del orden del nanomolar, entre los que están los 6 nanocuerpos con reactividad cruzada. Además, dos nanocuerpos, cAbVCAM1-1 y cAbVCAM1-5 tienen reactividad cruzada con el VCAM-1 de conejo. La elevada resistencia térmica de los nanocuerpos, en particular de cAbVCAM1-5 ha permitido su radiomarcado con ^{99m}Tc a 50°C con alta pureza radioquímica (> 95%). Además, los ensayos de enlace *in vitro* en células endoteliales de ratón VCAM-1 positivas han revelado que dichos nanocuerpos marcados seguían siendo ligandos específicos de mVCAM1.

25

[0145] A causa de su reducido tamaño, los nanocuerpos presentaban una rápida depuración sanguínea *in vivo*, resultante de una actividad circulatoria media de 0,8% ID/g 3 horas después de la inyección en los ratones ApoE^{-/-}. Además, la actividad de ruido de fondo en el miocardio también era mínima. De forma importante, la absorción de los nanocuerpos anti-VCAM1 en las lesiones aórticas era significativamente más elevada que la del nanocuerpo de control negativo cAbBcll10, en concreto para los nanocuerpos cAbVCAM1-5 y cAbVCAM1-3. Por consiguiente, las proporciones lesión/control, lesión/sangre y lesión/corazón también fueron superiores a 1, en concreto en los nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9.

30

35

Absorción en los tejidos linfáticos

[0146] Además de ser absorbidos en las lesiones ateroscleróticas, los nanocuerpos según la invención también han sido absorbidos por los tejidos linfáticos, a la vez en los ratones normales e hipercolesterolémicos, como demuestran los experimentos de biodistribución y de tomografía SPECT. En concreto, los tres nanocuerpos de reactividad cruzada con las mayores afinidades para mVCAM-1 (cAbVCAM1-5/3/9) han mostrado las mayores absorciones en el bazo y la médula ósea. La expresión constitutiva de mVCAM-1 se ha observado por inmunohistoquímica en el bazo, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el timo. Por consiguiente, la unión de los nanocuerpos anti-VCAM-1 a los tejidos linfáticos se debía probablemente a su unión específica a la proteína VCAM-1.

40

45

Selección de compuestos de interés particular

50

[0147] En base a los parámetros resumidos en la **Tabla 4**, los nanocuerpos cAbVCAM1-5, cAbVCAM1-3, cAbVCAM1-8 y cAbVCAM1-9 han sido identificados por los inventores como los que tienen propiedades particularmente ventajosas frente a otros nanocuerpos, en particular, con vistas a su utilización en la formación de imagen médica. El nanocuerpo más prometedor es el nanocuerpo cAbVCAM1-5. Efectivamente, cAbVCAM1-5 presenta las proporciones más elevadas de lesión/control y lesión/corazón, así como una fuerte proporción lesión/sangre. Presenta además una buena afinidad a la vez para VCAM-1 humano y murino, y la mayor resistencia

55

térmica y el rendimiento de producción más elevado. Por otro lado, cAbVCAM1-5 tiene reactividad cruzada con el VCAM-1 de conejo, un modelo animal de referencia en el estudio de la aterosclerosis. cAbVCAM1-3 presenta la proporción lesión/sangre más elevada y proporciones muy elevadas de lesión/control y lesión/corazón. cAbVCAM1-8 presenta una proporción lesión/corazón particularmente elevada y la mejor afinidad para VCAM-1 humano. Por último, cAbVCAM1-9 presenta la mejor incorporación en las lesiones ateroscleróticas y muy buenas afinidades para VCAM-1 humano y murino. Además, AbVCAM1-5, AbVCAM1-3 y AbVCAM1-9 no tienen lisina en sus CDR, lo que es una ventaja en la medida en que la presencia de lisina podría presentar un inconveniente para las técnicas de enlace que permiten marcar los nanocuerpos por fluorescencia o por radiomarcado, a través de sus residuos aminos, con vistas a la tomografía PET.

10

Formación de imagen *in vivo* de cAbVCAM1-5

[0148] ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 es estable *in vitro* hasta 6 horas después del radiomarcado, así como *in vivo* en la sangre de los ratones, como se demuestra por HPLC. Esto permite utilizar la tomografía SPECT/CT 3 horas después de la inyección. En ese momento, los inventores han identificado con éxito mediante la tomografía SPECT/CT las lesiones ateroscleróticas situadas en el cayado aórtico de ratón ApoE^{-/-}, con débil actividad de ruido de fondo en el miocardio y la sangre. La autorradiografía y la inmunohistoquímica han confirmado que la absorción aórtica de ^{99m}TccAbVCAM1-5 se dirigía a las lesiones ateroscleróticas VCAM-1 positivas. Por tanto, estos experimentos han mostrado que ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 es un radiomarcador apropiado para las técnicas de formación de imagen *in vivo* no invasivas de procesos inflamatorios que se producen en las lesiones ateroscleróticas.

20

Comparación con otros radiomarcadores

[0149] Recientemente se han evaluado otros radiomarcadores derivados de anticuerpos para la formación de imagen de placas de ateroma vulnerables utilizando la tomografía SPECT (Temma et al. (2010) J. Nucl. Med. 51:1979-1986; Kuge et al. (2010) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 37:2093-2104). Sin embargo, la reducida depuración de los anticuerpos completos produce proporciones objetivo/ ruido de fondo insuficientes, lo que destaca la necesidad de utilizar fragmentos de anticuerpo. Entre los radiomarcadores anteriormente evaluados para la formación de imagen médica SPECT o PET, las lesiones ateroscleróticas, el ¹⁸FDG ha demostrado una absorción elevada en los macrófagos, que permite el uso de técnicas de formación de imagen *in vivo* de lesiones carotídeas en el hombre (Rudd et al. (2002) Circulation 105:2708-2711). Sin embargo, a causa del fuerte ruido de fondo en el miocardio, la formación de imagen de las lesiones coronarias sigue siendo muy difícil, a pesar del uso potencial de un régimen específico destinado a disminuir la absorción en el miocardio (Wykrzykowska et al. (2009) J. Nucl. Med. 50:563-568). De forma similar, en un modelo de ratón de aterosclerosis, Laitinen et al. han demostrado que la absorción en el miocardio de ¹⁸FDG era de 18,13±10,59 %ID/g frente a 0,41±0,16 %ID/g en las lesiones ateroscleróticas 1 hora después de la inyección (Laitinen et al. (2006) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 33:1461-1467).

40

Conclusión

[0150] De este modo, los presentes inventores han identificado y producido cuatro nanocuerpos anti-VCAM-1, con reactividad cruzada para VCAM-1 humano, que presentan características importantes para un uso en formación de imagen médica. En particular, los inventores han demostrado directamente que ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 permitía identificar con éxito lesiones ateroscleróticas *in vivo* mediante la tomografía SPECT/CT.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

[0151]

50 <110> Université Joseph Fourier

<120> Nanocorps anti-VCAM-1

<130> BET12P2177

55

<150> FR 11 57478

<151> 2011-08-23

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR1 de cAbVCM1-5

<400> 1

Tyr Thr Asn Ser Ile Met Tyr Met Ala
1 5

15

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> CDR2 de cAbVCAM1-5

<400> 2

25

Ala Ile Arg Phe Pro Asp Asp Ser
1 5

<210> 3

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de cAbVCAM1-5

35

<400> 3

Arg Ser Ser Pro Tyr Ser Phe Ala Trp Asn Asp Pro Ser Asn Tyr Asn
1 5 10 15

Tyr

40 <210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> CDR1 de cAbVCAM1-3

ES 2 614 955 T3

<400> 4

Phe Thr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5

5 <210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR2 de cAbVCAM1-3

<400> 5

Gly Ile Asn Val Asp Gly Ser Asn
1 5

15

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de cAbVCAM1-3

25 <400> 6

Gly Ser Gly Arg Asp Ser Tyr Asp Cys Tyr Ser Gly Ser Trp Cys Pro
1 5 10 15

<210> 7
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> CDR1 de cAbVCAM1-8

<400> 7

Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Thr
1 5

40

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> CDR2 de cAbVCAM1-8

ES 2 614 955 T3

<400> 8

Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser
1 5

5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> CDR3 de cAbVCAM1-8

<400> 9

15

Gly Lys Ser Ser Val
1 5

<210> 10
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cAbVCAM1-9

25

<400> 10

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5

30

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> CDR2 de cAbVCAM1-9

<400> 11

Gly Ile Asn Val Asp Gly Ser Asn
1 5

40

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>

ES 2 614 955 T3

<223> CDR3 de cAbVCAM1-9

<400> 12

Gly Ser Gly Arg Asp Ser Tyr Asp Cys Tyr Ser Gly Ser Trp Cys Pro
 1 5 10 15

5

<210> 13

<211> 126

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> cAbVCAM1-5

15 <400> 13

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Phe Pro Asp Asp Ser Ala Tyr Tyr Ala Gly Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Arg Ser Ser Pro Tyr Ser Phe Ala Trp Asn Asp Pro Ser Asn
 100 105 110

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

<210> 14

20 <211> 125

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 614 955 T3

<220>

<223> cAbVCAM1-3

<400> 14

5

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85

90

95

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

Cys Pro Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cAbVCAM1-8

15

<400> 15

ES 2 614 955 T3

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 17
<211> 26
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR1 de cAbVCAM1-5
10 <400> 17

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

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

15 <210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> FR2 de cAbVCAM1-5
<400> 18

ES 2 614 955 T3

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Glu Gly Val Ala
1 5 10

<210> 19
5 <211> 41
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> FR3 de cAbVCAM1-5

<400> 19

Ala Tyr Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser His Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Asn Pro Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala
35 40

15
<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> FR4 de cAbVCAM1-5

<400> 20

25

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 26
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR1 de cAbVCAM1-3

35

<400> 21

ES 2 614 955 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
20 25

<210> 22
<211> 14
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR2 de cAbVCAM1-3
10
<400> 22

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

15 <210> 23
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> FR3 de cAbVCAM1-3

<400> 23

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr
35 40

25

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> FR4 de cAbVCAM1-3

35 <400> 24

ES 2 614 955 T3

Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 25
<211> 26
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR1 de cAbVCAM1-8
10
<400> 25

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

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

15 <210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> FR2 de cAbVCAM1-8
<400> 26

Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

25 1 5 10

<210> 27
<211> 41
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> FR3 de cAbVCAM1-8
35 <400> 27

ES 2 614 955 T3

Thr Leu Tyr Leu Pro Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
20 25 30

Asp Thr Gly Trp Tyr Tyr Cys Val Glu
35 40

<210> 28
<211> 11
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR4 de cAbVCAM1-8
10
<400> 28

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

15 <210> 29
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> FR1 de cAbVCAM1-9
<400> 29

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

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

25
<210> 30
<211> 14
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> FR2 de cAbVCAM1-9
35 <400> 30

ES 2 614 955 T3

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 41
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR3 de cAbVCAM1-9
10
<400> 31

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr
35 40

15 <210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> FR4 de cAbVCAM1-9

<400> 32

Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25

<210> 33
<211> 132
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> cAbVCAM1-5 6His
35
<400> 33

ES 2 614 955 T3

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His
 115 120 125

His His His
 130

<210> 35
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 6His

10 <400> 35

ES 2 614 955 T3

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

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

Tyr Met Thr Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Thr Leu Tyr Leu Pro Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Gly Trp Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Glu Gly Lys Ser Ser Val Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser His His His His His His
 115

<210> 36
 <211> 131
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cAbVCAM1-9 6His

10 <400> 36

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

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

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

REIVINDICACIONES

1. Nanocuerpo dirigido contra VCAM-1 que comprende:
 - 5 a) las secuencias de aminoácidos (i) YTNSIMYMA (SEQ ID NO: 1) como CDR1, (ii) AIRFPDDS (SEQ ID NO: 2) como CDR2 y (iii) RSPYSFAWNDPSNYNY (SEQ ID NO: 3) como CDR3; o b) las secuencias de aminoácidos (i) FTYSSYYMS (SEQ ID NO: 4) como CDR1, (ii) GINVDGSN (SEQ ID NO: 5) como CDR2 y (iii) GSGRDSYDCYSGSWCP (SEQ ID NO: 6) como CDR3; o c) las secuencias de aminoácidos (i) FTFSNYYMT (SEQ ID NO: 7) como CDR1, (ii) RINSDGS (SEQ ID NO: 8) como CDR2 y (iii) GKSSV (SEQ ID NO: 9) como CDR3; o d)
 - 10 las secuencias de aminoácidos (i) FTFSSYYMS (SEQ ID NO: 10) como CDR1, (ii) GINVDGSN (SEQ ID NO: 11) como CDR2 y (iii) GSGRDSYDCYSGSWCP (SEQ ID NO: 12) como CDR3;
 - o una variante funcionalmente conservadora del nanocuerpo definida en a), b), c) o d) que comprende una sustitución conservadora de uno o dos aminoácidos en, respectivamente una, dos o tres de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.
2. Nanocuerpo según la reivindicación 1, donde dicho nanocuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.
 - 20 3. Nanocuerpo según la reivindicación 1 o 2, donde dicho nanocuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13.
4. Nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho nanocuerpo está asociado a
 - 25 un marcador detectable.
 5. Nanocuerpo según la reivindicación 4, donde dicho marcador detectable es un radioelemento.
 6. Nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como agente de contraste en
 - 30 la formación de imagen médica *in vivo*, no invasiva.
 7. Nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en métodos de diagnóstico o de pronóstico.
 - 35 8. Nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para utilizarlo como medicamento.
 9. Uso de un nanocuerpo como el que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la detección *in vitro* de VCAM-1 en una muestra.
 - 40 10. Compuesto farmacéutico que comprende un nanocuerpo como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 asociado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 11. Ácido nucleico que comprende una secuencia nucleica codificante del nanocuerpo como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
 - 45 12. Vector que comprende un ácido nucleico como el definido en la reivindicación 11.
 13. Célula transfectada, infectada o transformada con un ácido nucleico según la reivindicación 11 o un vector según la reivindicación 12.
 - 50 14. Método de producción de una célula anfitriona recombinante que expresa un nanocuerpo como el que se ha definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho método comprende las etapas que consisten en:
 - 55 (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico según la reivindicación 11 o un vector según la reivindicación 12 en una célula anfitriona competente,
 - (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula anfitriona recombinante obtenida y
 - (iii) eventualmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho nanocuerpo.

15. Método de producción de un nanocuerpo como el que se ha definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho método comprende las etapas que consisten en:

- (i) cultivar una célula transfectada o infectada o transformada según la reivindicación 13, en condiciones apropiadas para permitir la expresión de dicho nanocuerpo, y
- (ii) recuperar el nanocuerpo expresado.

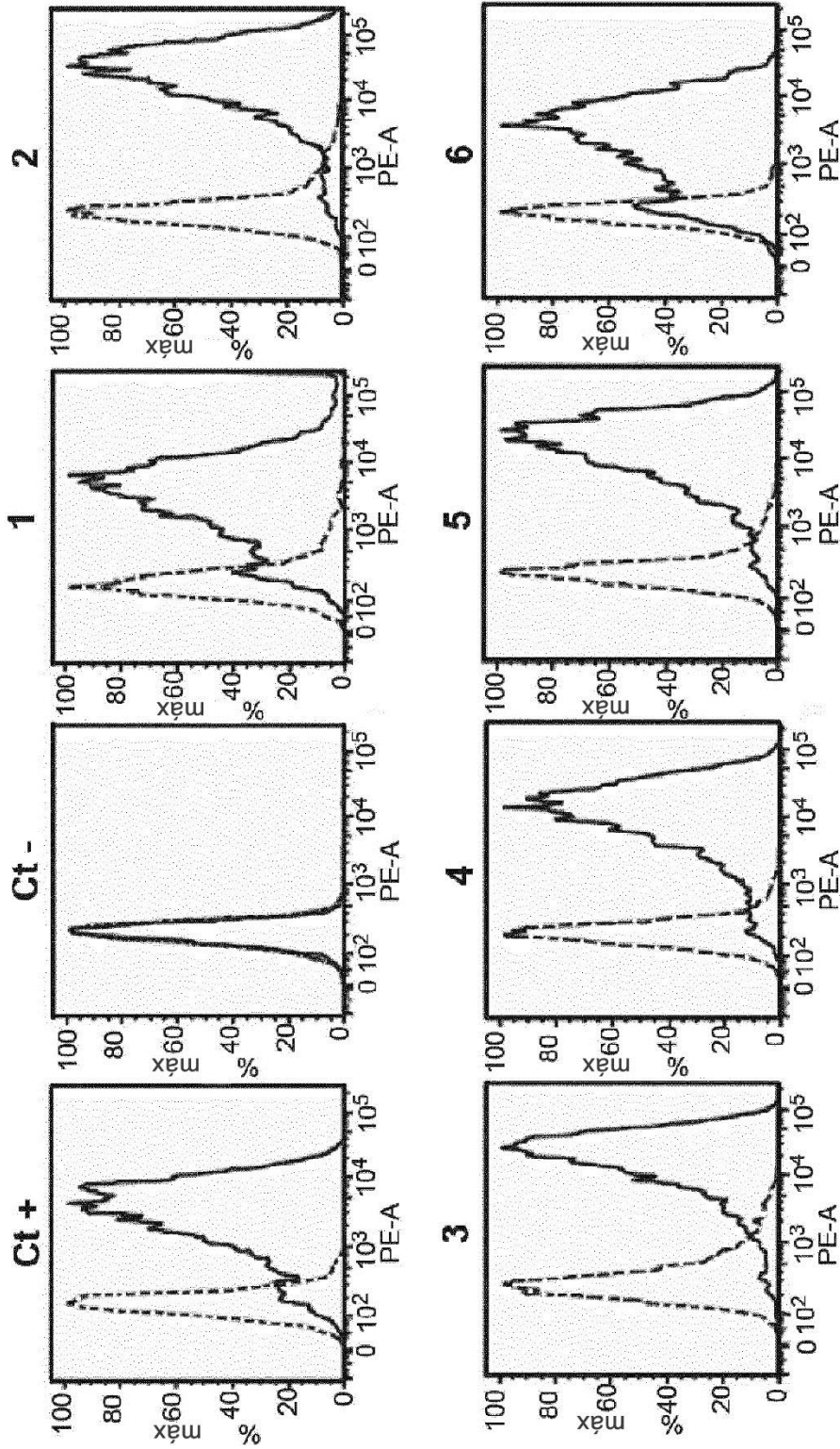


FIG.1 (Principio)

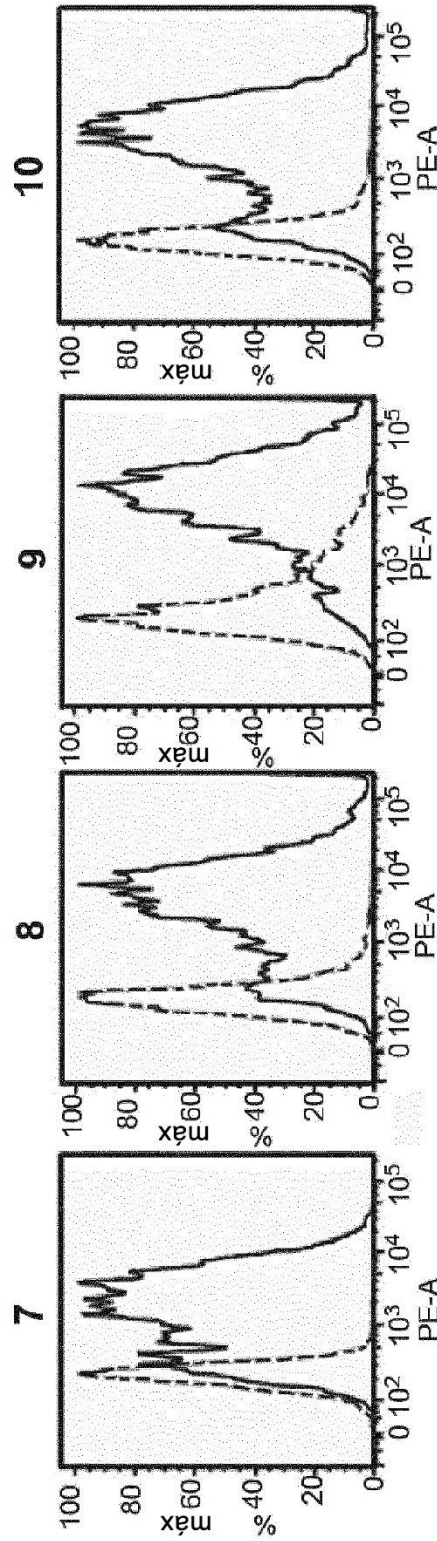


FIG.1 (Fin)

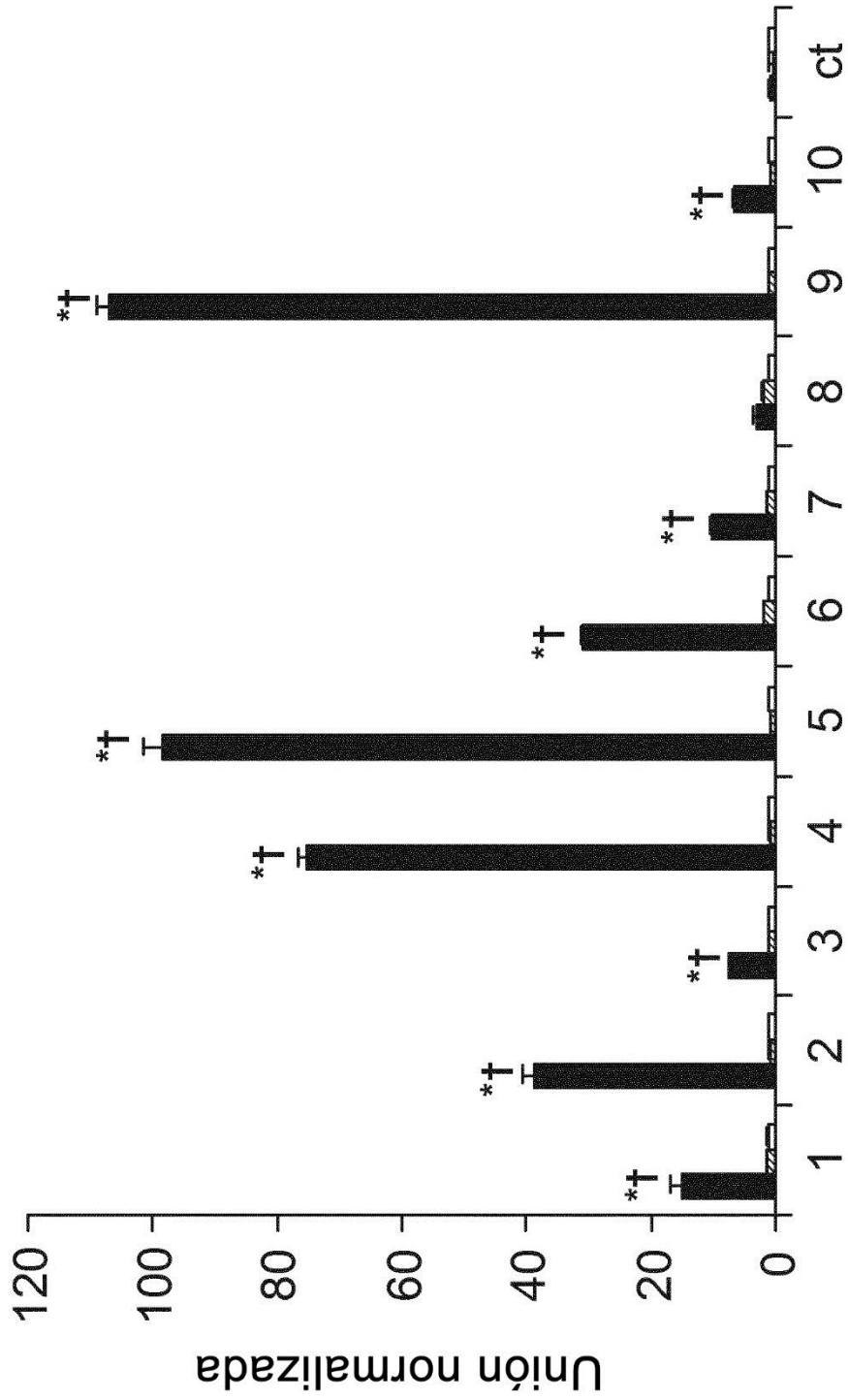


FIG.2

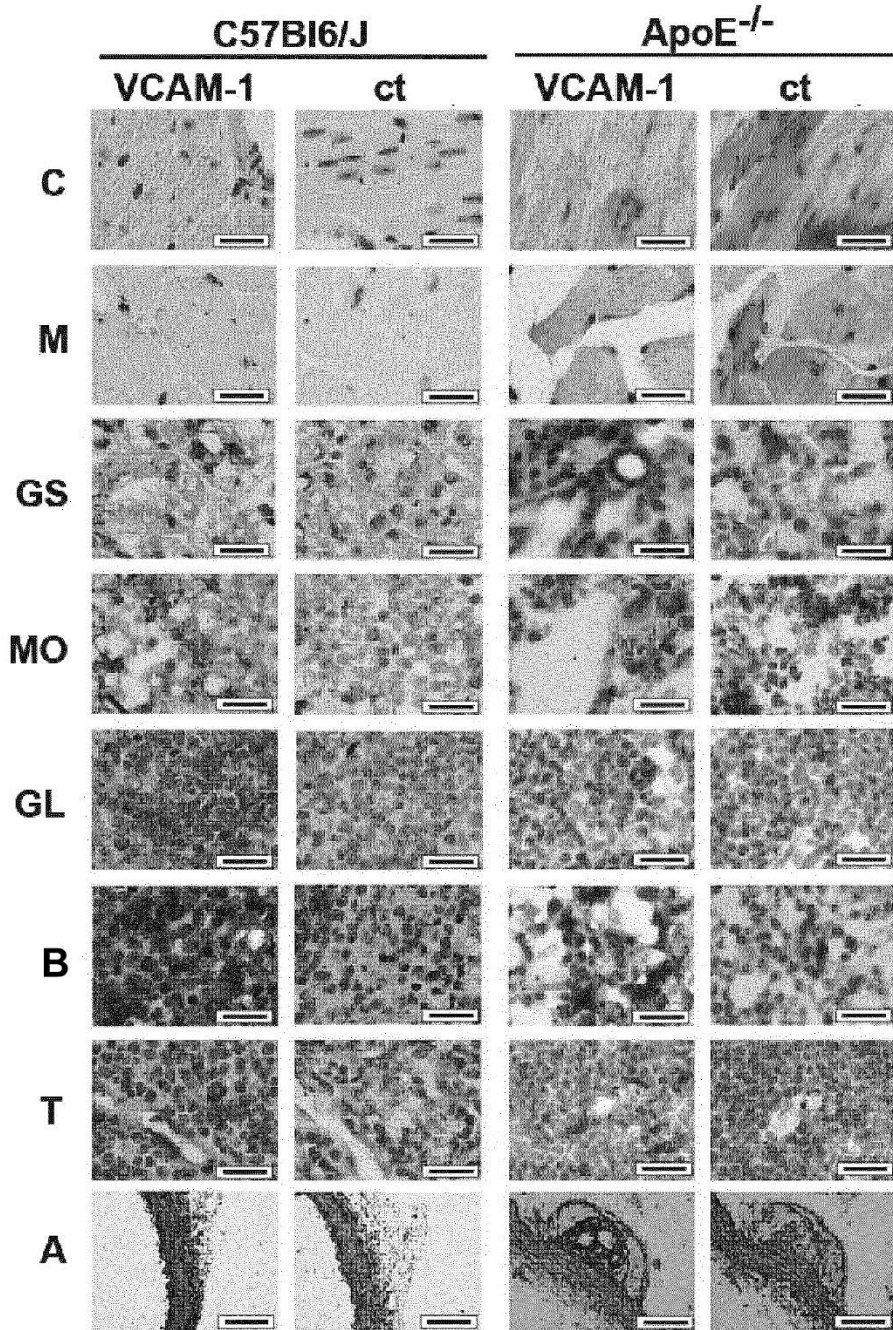


FIG.3

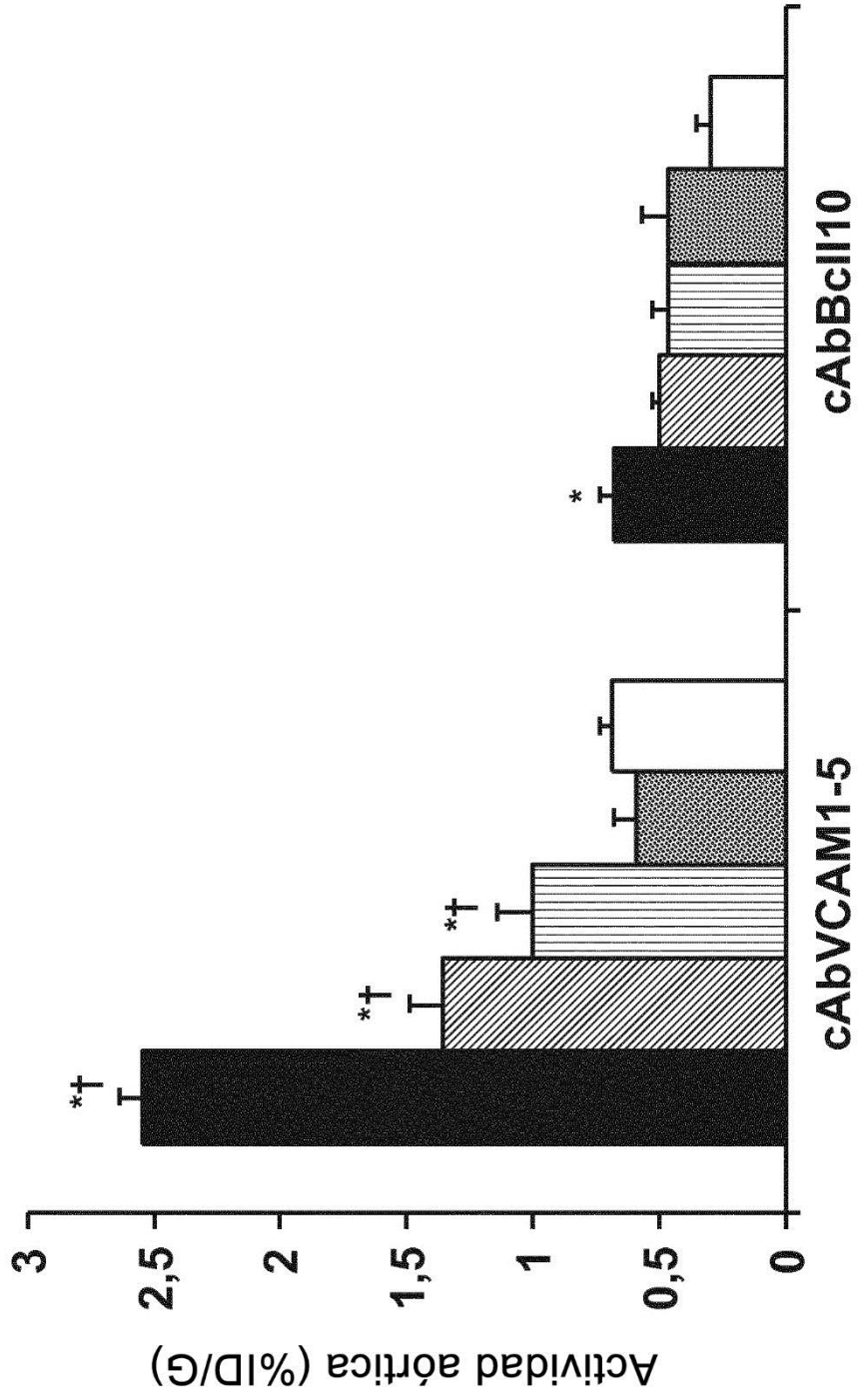


FIG.4

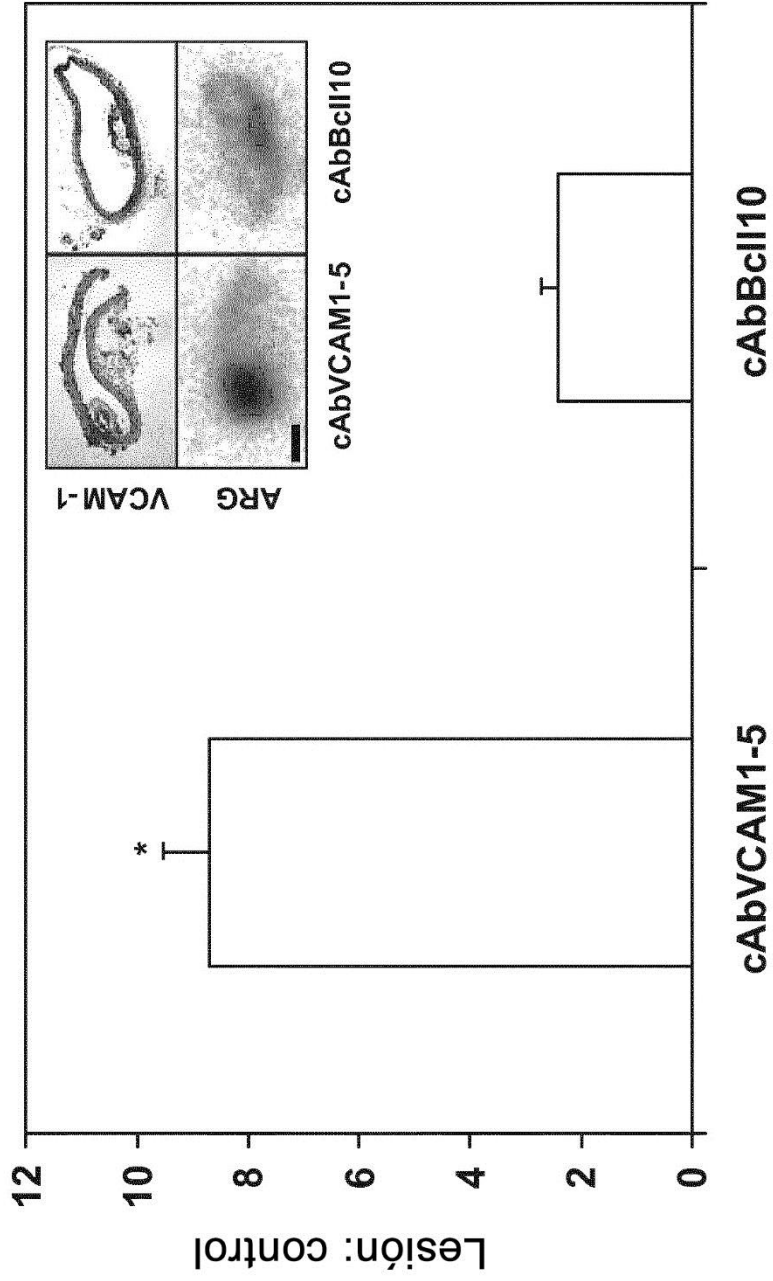


FIG.5

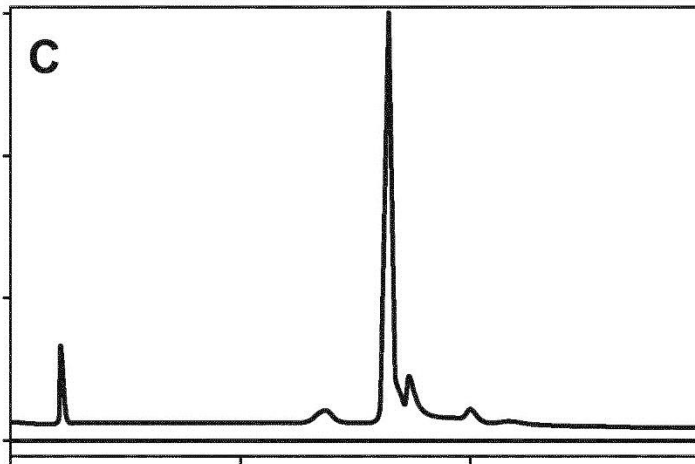
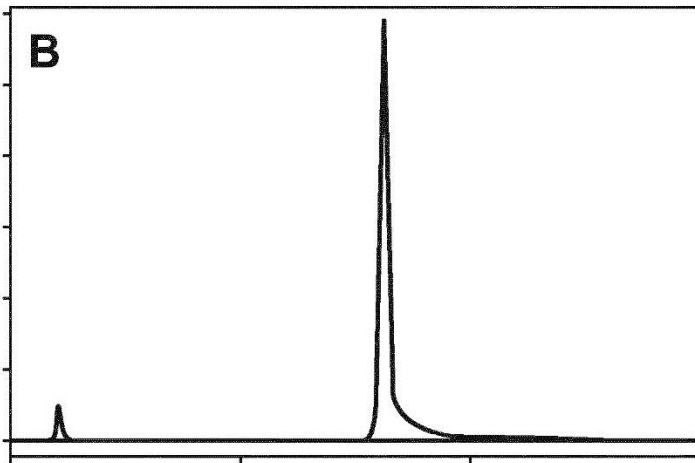
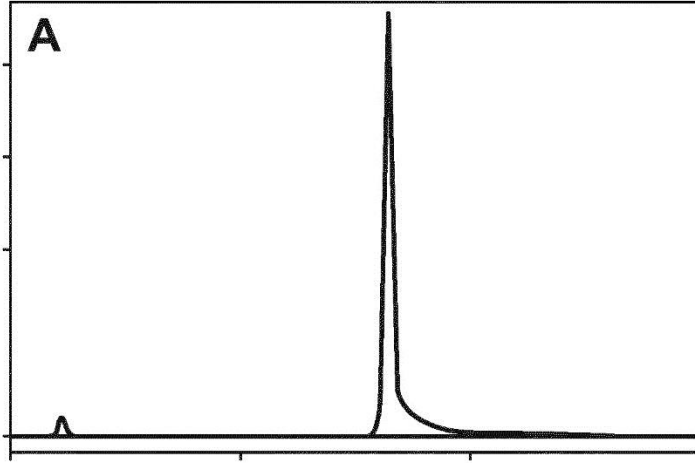


FIG.6



FIG.7

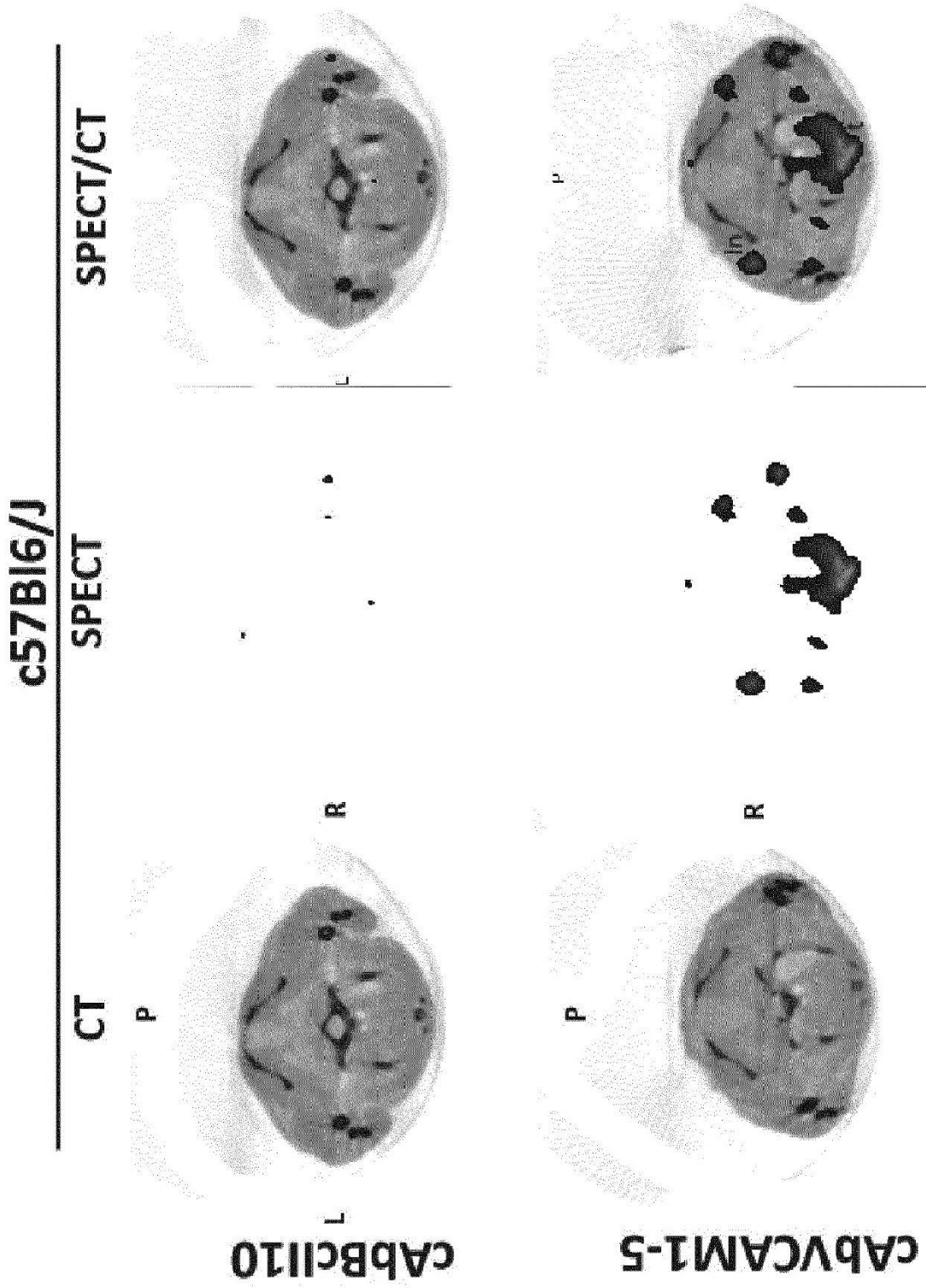


FIG.8

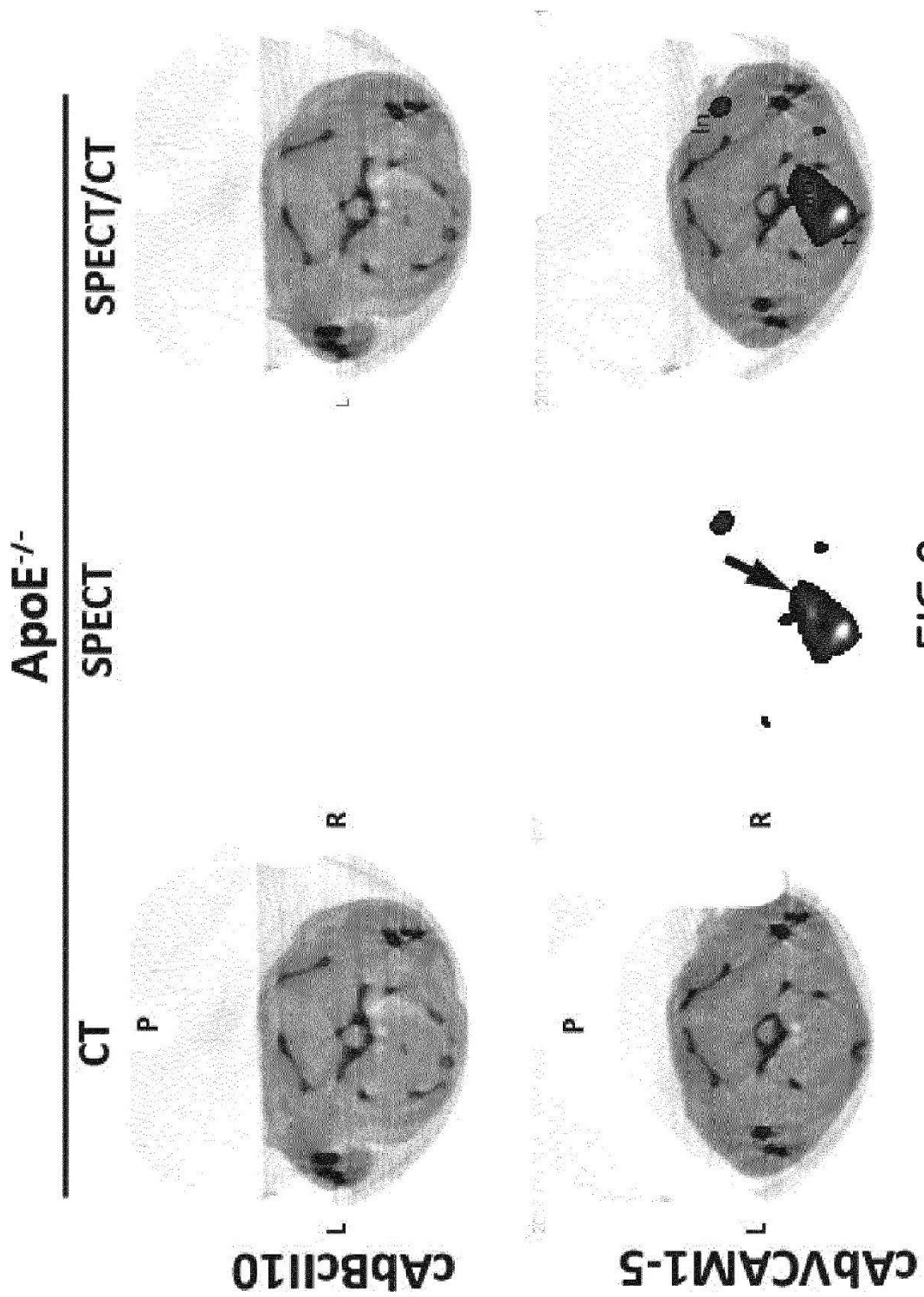


FIG.9

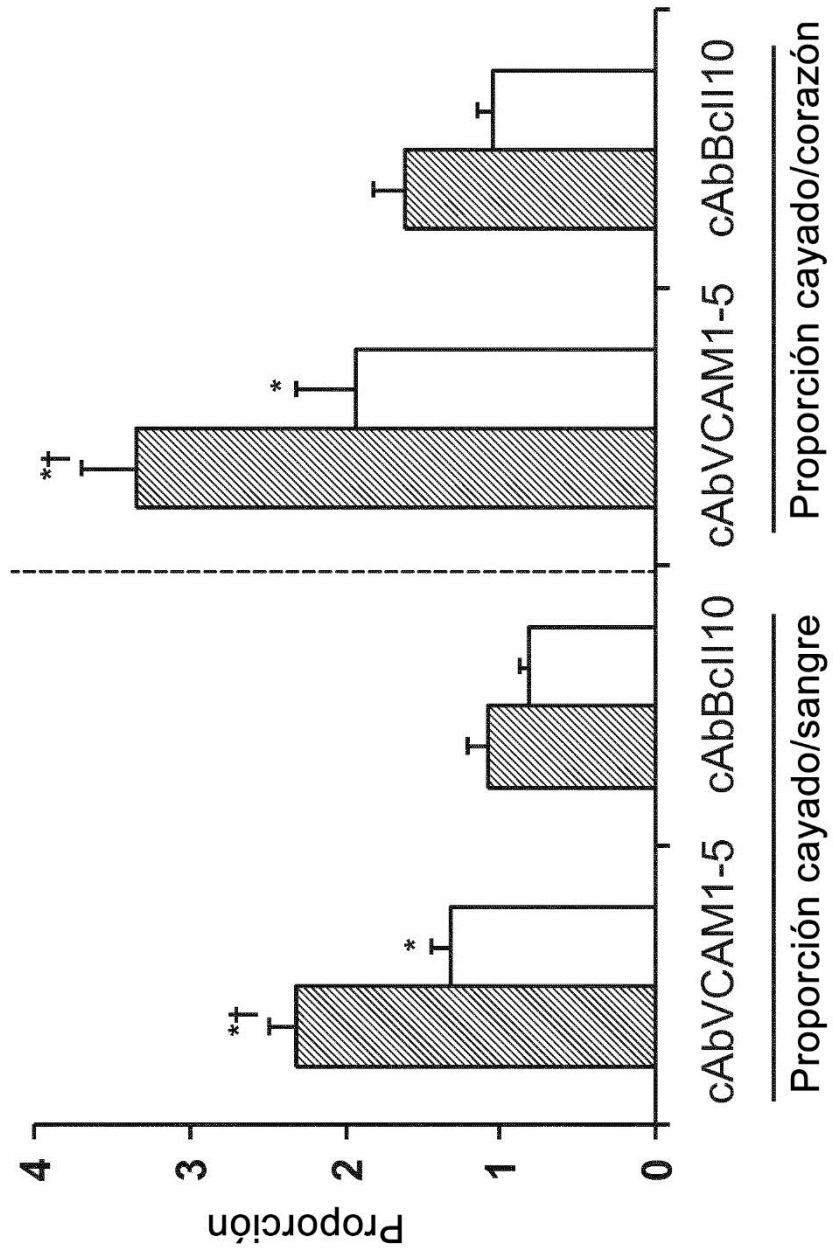


FIG.10

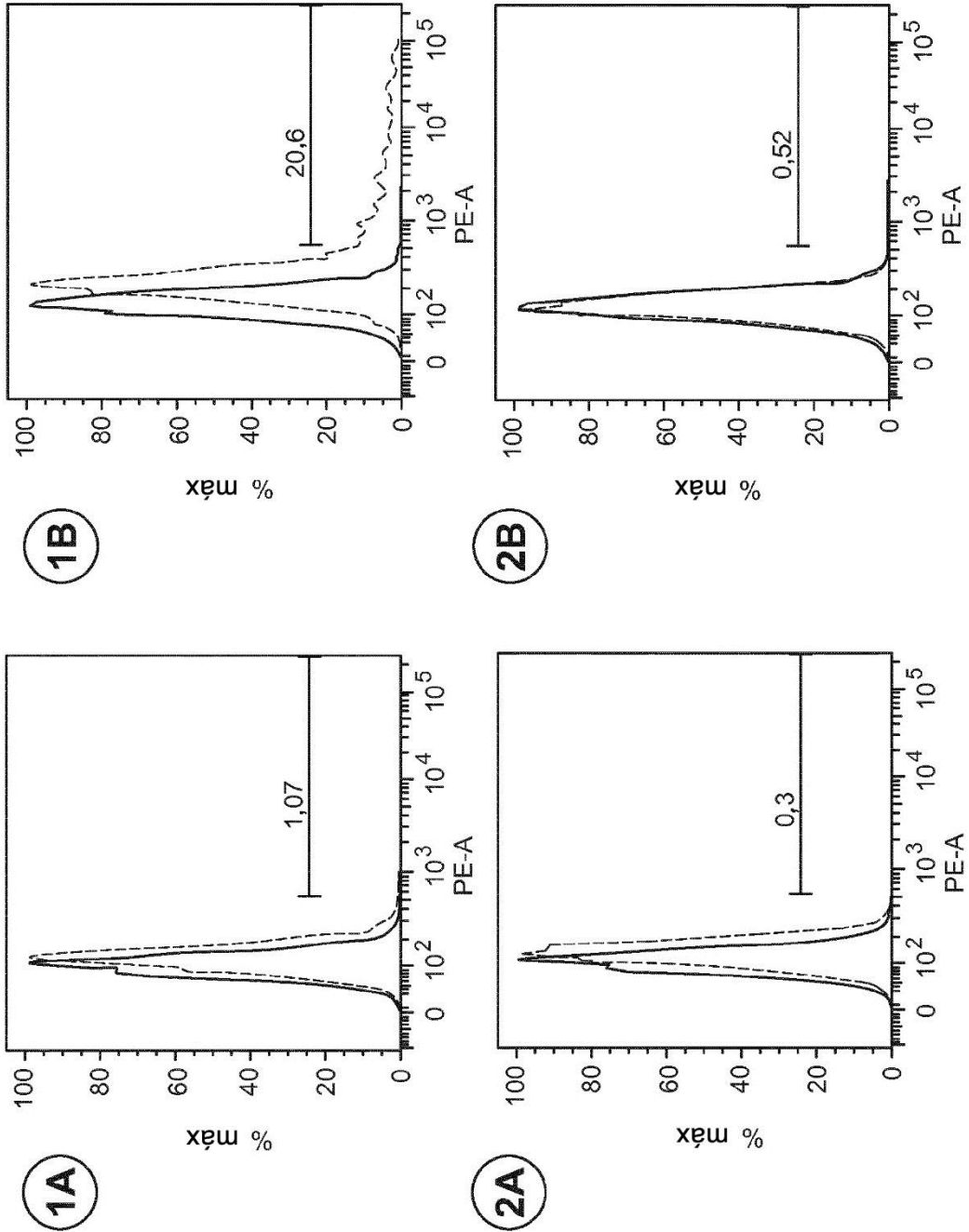


FIG.11
(Principio)

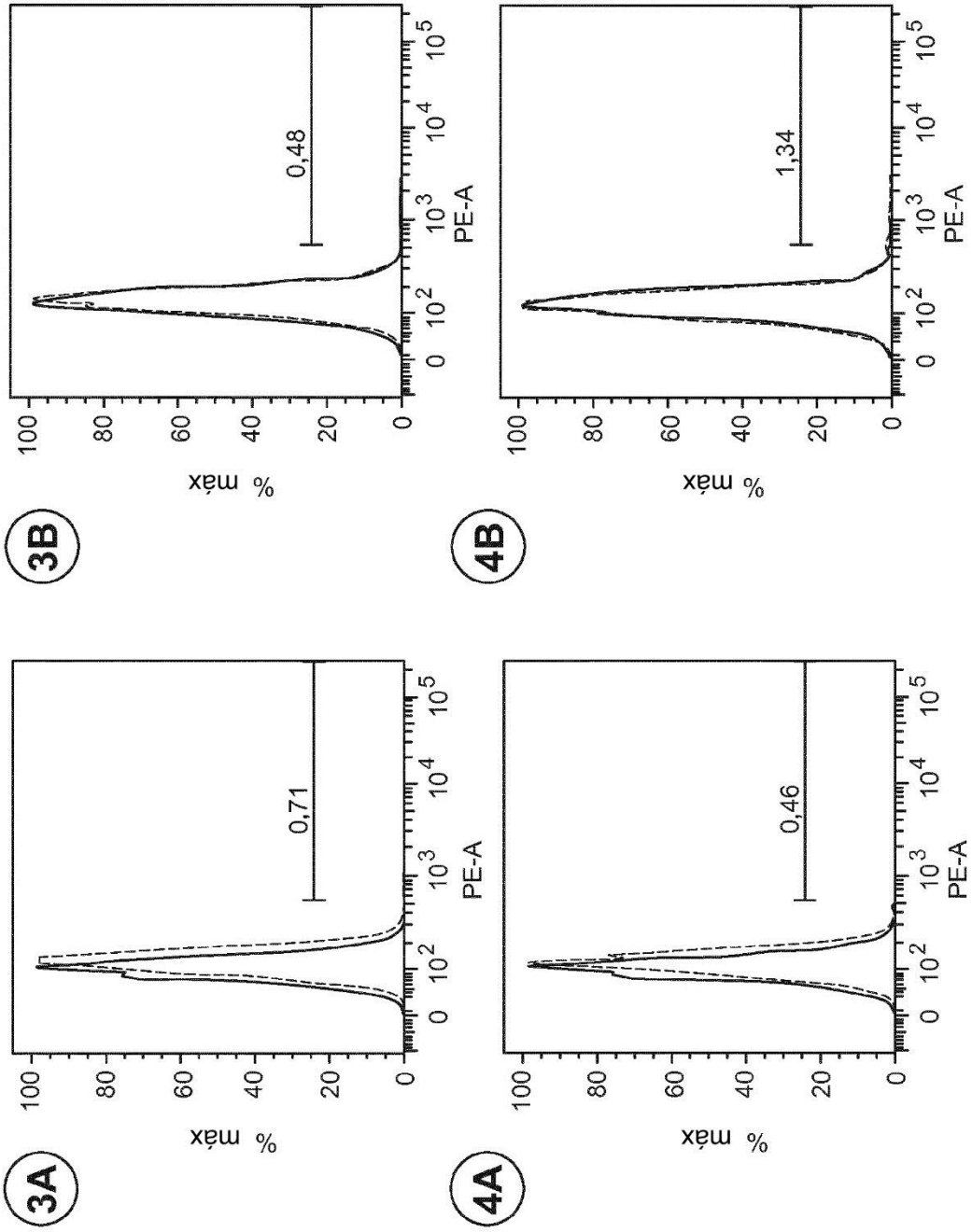


FIG.11
(Continuación)

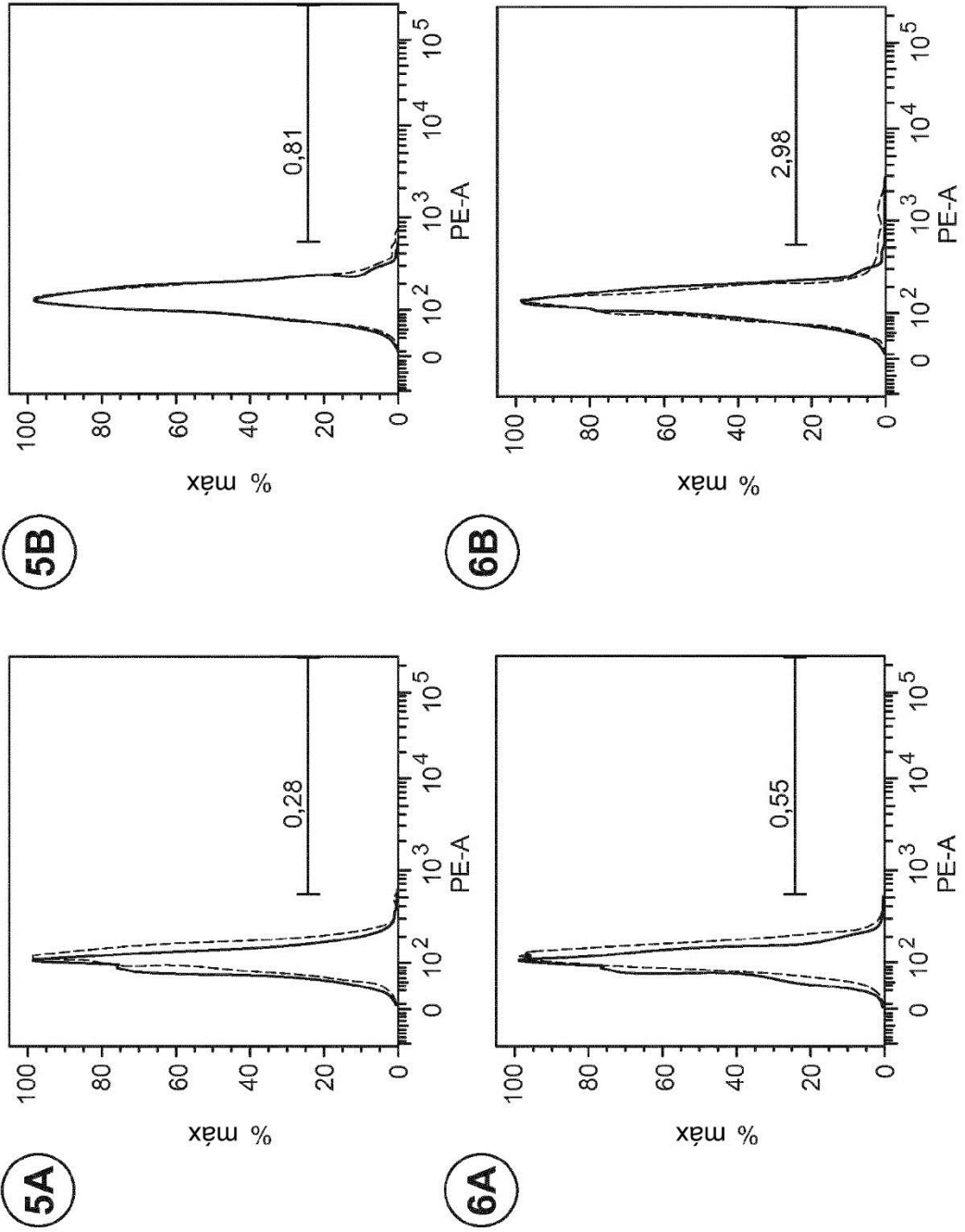


FIG.11
(Continuación)

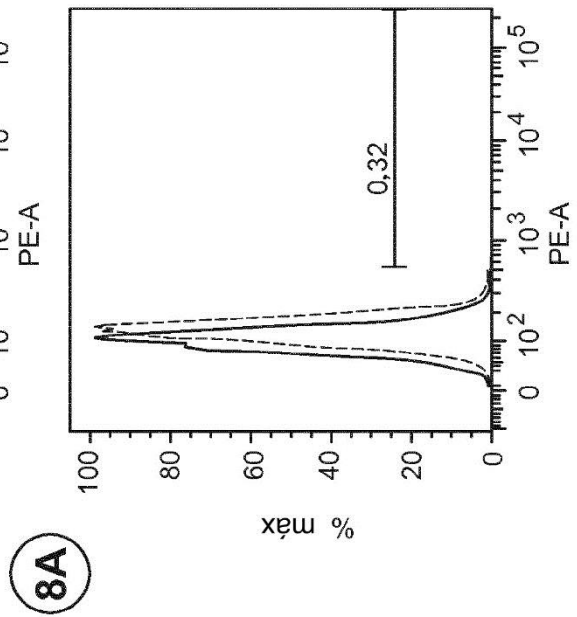
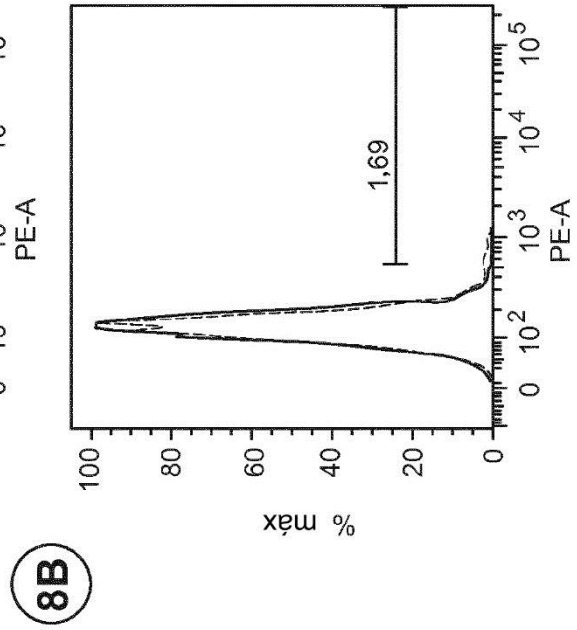
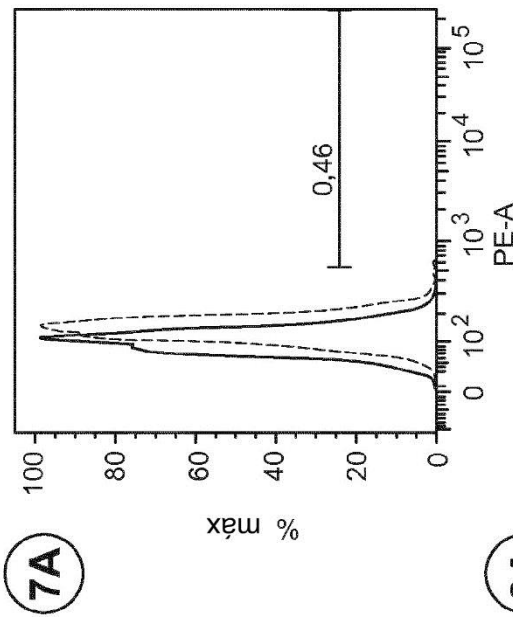
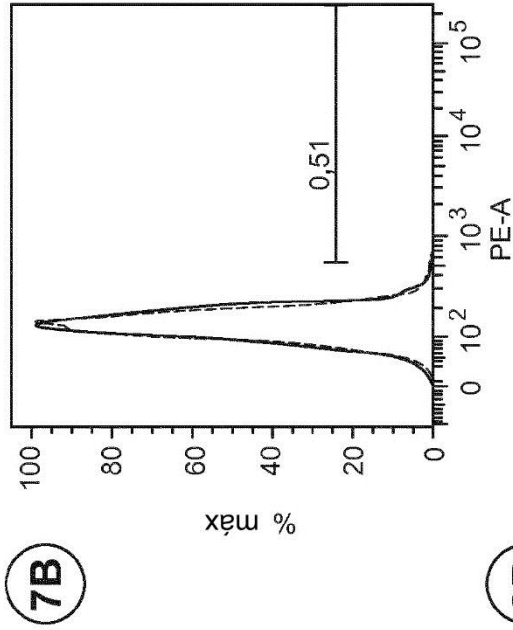


FIG.11
(Continuación)

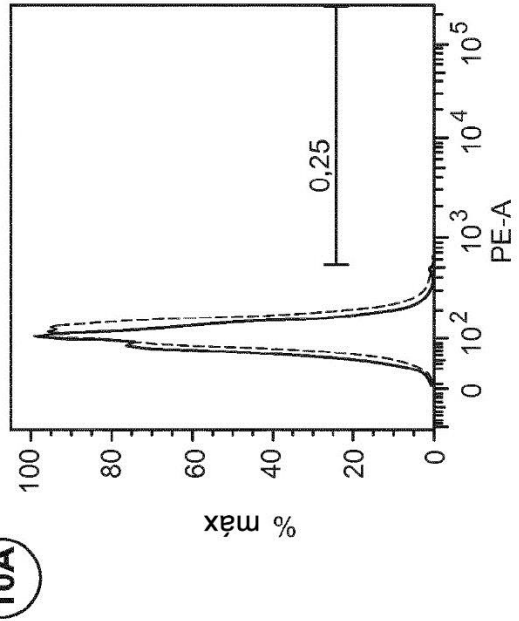
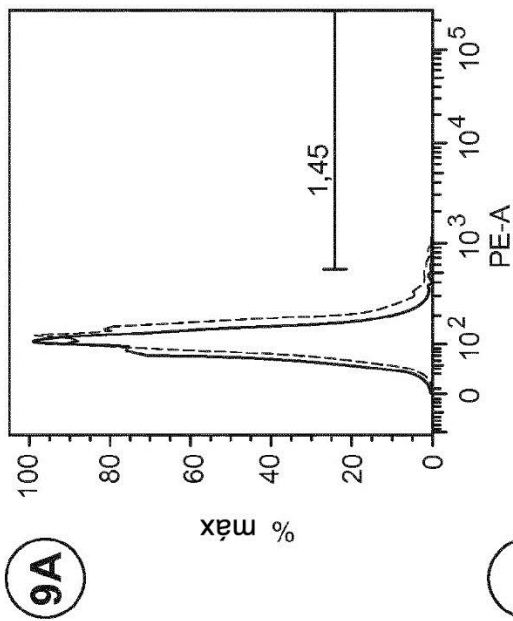
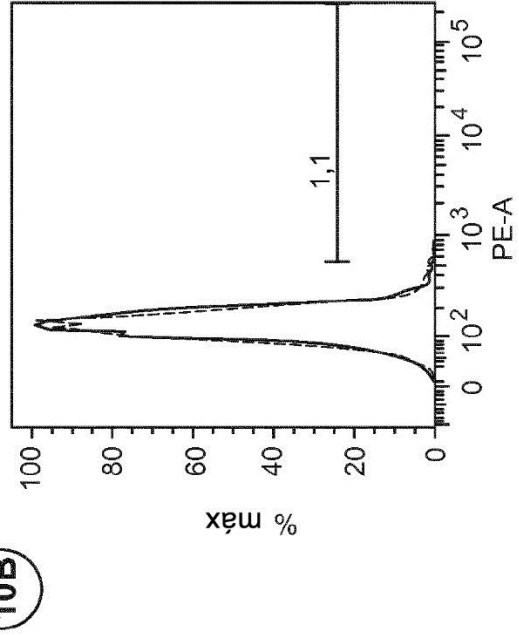
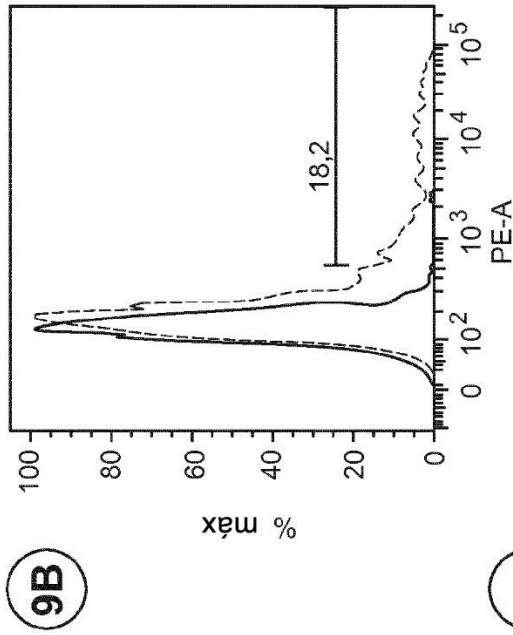


FIG.11
(Fin)