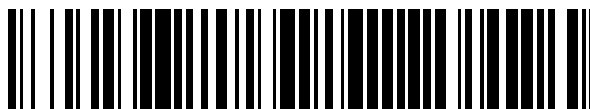


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 247**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/36** (2006.01)

**A61K 38/36** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2006 E 12151893 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2444424**

54 Título: **Nanobodies™ mejorados para el tratamiento de trastornos mediados por agregación**

30 Prioridad:

**20.05.2005 US 683474 P**

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

**19.12.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SILENCE, KAREN**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 694 247 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

Nanobodies™ mejorados para el tratamiento de trastornos mediados por agregación

5 La presente invención se refiere a una proteína o un polipéptido que comprende dos Nanobodies™ mejorados contra factor de von Willebrand (vWF), tal como se define en las reivindicaciones. [Nota: Nanobody™, Nanobodies™ y Nanoclone™ son marcas comerciales de Ablynx N.V.]

10 La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales Nanobodies y polipéptidos; a métodos para preparar tales Nanobodies y polipéptidos; a células huésped que expresan o pueden expresar tales Nanobodies o polipéptidos; a composiciones que comprenden tales Nanobodies, polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped; y a usos de tales Nanobodies, tales polipéptidos, tales ácidos nucleicos, tales células huésped o tales composiciones, en particular para propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, tales como los propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico mencionados más adelante.

15 Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención resultarán claros a partir de la descripción adicional a continuación en el presente documento.

20 El documento WO 04/062551 del solicitante se refiere a Nanobodies contra factor de von Willebrand (vWF) y a la preparación y uso de los mismos, en particular la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con la agregación mediada por plaquetas.

25 Los Nanobodies anti-vWF según el documento WO 04/062551 pueden estar humanizados y pueden ser monovalentes o multivalentes, lo último de lo cual conduce a una afinidad aumentada por vWF. Los Nanobodies anti-vWF según el documento WO 04/062551 pueden ser también multiespecíficos, y pueden estar en particular en forma de un constructo multiespecífico que comprende dos o más Nanobodies contra vWF y un Nanobody adicional dirigido contra una proteína sérica tal como albúmina sérica humana, lo que conduce a una semivida aumentada *in vivo*.

30 Los Nanobodies anti-vWF descritos en el documento WO 04/062551 pueden estar dirigidos contra cualquier epítipo o conformación de vWF (tal como el dominio A1 o el dominio A3), pero están dirigidos preferiblemente contra el dominio A1, y en particular contra la conformación activada del dominio A1.

35 El documento WO 04/062551 también describe la preparación de los Nanobodies anti-vWF, secuencias de nucleótidos que codifican los Nanobodies anti-vWF, así como composiciones farmacéuticas que comprenden los Nanobodies anti-vWF.

40 Los Nanobodies anti-vWF y composiciones descritos en el documento WO 04/062551 pueden usarse para la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con la agregación mediada por plaquetas, tales como la formación de un trombo no oclusivo, la formación de un trombo oclusivo, formación de trombos arteriales, oclusión coronaria aguda, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis y trastornos que surgen del injerto de derivación coronaria, valvuloplastia de arterias coronarias e intervenciones coronarias tales como angioplastia, colocación de endoprótesis o aterectomía, hiperplasia tras angioplastia, aterectomía o colocación de endoprótesis arteriales, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de arterias enfermas, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho estable o inestable, infarto cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomía carotídea, estenosis de arteria carótida, isquemia crítica de las extremidades, cardioembolia, enfermedad vascular periférica, reestenosis e infarto de miocardio.

50 Las composiciones farmacéuticas descritas en el documento WO 04/062551 pueden ser adecuadas para administración intravenosa, subcutánea, oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal o rectal, o para administración mediante inhalación; y pueden comprender también un agente trombolítico, tal como estafilocinasa, activador de plasminógeno tisular, estreptocinasa, estreptocinasa de cadena sencilla, urocinasa y complejo de acil-plasminógeno-estreptocinasa. Los Nanobodies anti-vWF descritos en el documento WO 04/062551 pueden usarse también para propósitos de diagnóstico (opcionalmente en forma de un kit de partes) o en recubrimientos para dispositivos médicos tales como endoprótesis.

Un objeto general de la presente invención es proporcionar Nanobodies contra vWF, en particular contra vWF humano.

60 En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar Nanobodies contra vWF, en particular contra vWF humano, y proporcionar proteínas o polipéptidos que comprenden los mismos, que son adecuados para uso terapéutico y/o de diagnóstico, y en particular para la prevención, el tratamiento y/o el diagnóstico de una o más enfermedades y trastornos asociados con y/o mediados por vWF tales como los mencionados anteriormente, y/o que pueden usarse en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades asociadas con y/o mediadas por vWF, tales como las mencionadas anteriormente.

Más en particular, un objeto de la invención es proporcionar Nanobodies contra vWF, y proporcionar proteínas y polipéptidos que comprenden los mismos, que son o bien una alternativa a los Nanobodies y polipéptidos contra vWF descritos en el documento WO 04/062551 y/o bien que tienen una o más propiedades o características mejoradas, en comparación con los Nanobodies y polipéptidos contra vWF descritos en el documento WO 04/062551.

Más en particular, un objeto de la invención es proporcionar Nanobodies contra vWF, y proporcionar proteínas o polipéptidos que comprenden los mismos, que están mejorados en comparación con los Nanobodies y polipéptidos contra vWF descritos en el documento WO 04/062551 con respecto a una o más de las siguientes propiedades o características:

- afinidad aumentada por vWF, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/062551 o en el presente documento más adelante);

- mejor idoneidad para formatear en un formato multivalente (por ejemplo en un formato bivalente);

- mejor idoneidad para formatear en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/062551 o a continuación en el presente documento);

- idoneidad o susceptibilidad mejorada para "humanizar" sustituciones (tal como se define en el presente documento); y/o

- menos inmunogenicidad, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/062551 o a continuación en el presente documento) en un formato monovalente;

- estabilidad aumentada, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/062551 o a continuación en el presente documento) en un formato monovalente;

- especificidad aumentada hacia vWF, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/062551 o a continuación en el presente documento) en un formato monovalente;

- reactividad cruzada disminuida o cuando se desee aumentada con vWF de diferentes especies;

y/o

- una o más de otras propiedades mejoradas deseables para uso farmacéutico (incluyendo uso profiláctico y/o uso terapéutico) y/o para uso de diagnóstico (incluyendo pero sin limitarse a uso para propósitos de obtención de imágenes), o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/062551 o a continuación en el presente documento).

Estos objetos se logran mediante los Nanobodies contra vWF y mediante los polipéptidos descritos en el presente documento. Los Nanobodies contra vWF y polipéptidos descritos en el presente documento están dirigidos en particular contra vWF humano, pero se incluye dentro del alcance de la invención que algunos de los Nanobodies anti-vWF y polipéptidos de la invención puedan mostrar reactividad cruzada con vWF de otros animales vertebrados, en particular de otros animales de sangre caliente, más en particular de otros mamíferos, y en particular de otras especies de primates, tales como los babuinos usados en los ejemplos más adelante. Sin embargo, como con los Nanobodies anti-vWF descritos en el documento WO 04/062551, la presente invención en su sentido más amplio no está particularmente limitada a o definida por un epítipo, dominio o conformación de vWF particular contra el que los Nanobodies y polipéptidos de la invención están dirigidos. Sin embargo, se supone y se prefiere generalmente que los Nanobodies y polipéptidos de la invención estén dirigidos contra el dominio A1 de vWF, o bien en su conformación activada o bien no activada.

Por tanto, la invención se refiere a:

1. Una proteína o un polipéptido, which comprende dos VHH, dominios VHH humanizados o dominios VH camelizados, en el que dichos VHH, dominios VHH humanizados o dominios VH camelizados están dirigidos contra factor de von Willebrand (vWF), y dichos VHH, dominios VHH humanizados o dominios VH camelizados consisten en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

- i) CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos YNPMG [SEQ ID NO: 22];

y en el que:

ii) CDR2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

5 AISRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID NO: 32], y

AISRTGGSTYYARSVEG [SEQ ID NO: 31];

10 y en las que:

iii) CDR3 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

15 AGVRAEDGRVRTLPSEYTF [SEQ ID NO: 42],

AGVRAEDGRVRLPSEYTF [SEQ ID NO: 43], y

AGVRAEDGRVRTLPSEYNF [SEQ ID NO: 41].

20 2. La proteína o el polipéptido según el punto 1, en el que:

i) CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos YNPMG [SEQ ID NO: 22];

y en el que:

25 ii) CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID NO: 32];

y en el que:

30 iii) CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF [SEQ ID NO: 42].

3. La proteína o el polipéptido según cualquiera de los puntos 1-2, en el que dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados son  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados de clase KERE.

35 4. La proteína o el polipéptido según cualquiera de los puntos 1-3, en el que dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados son variantes humanizadas de dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados.

40 5. La proteína o el polipéptido según cualquiera de los puntos 1-4, en el que los  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados presentan en la proteína o el polipéptido se eligen del grupo que consiste en los  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados 12B6 (SEQ ID NO: 62); 12A2 (SEQ ID NO: 71); 12F2 (SEQ ID NO: 72); 14H10 (SEQ ID NO: 73); 12B6H1 (SEQ ID NO: 86); 12B6H2 (SEQ ID NO: 87); 12B6H3 (SEQ ID NO: 88); 12B6H4 (SEQ ID NO: 89); 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

45 6. La proteína o el polipéptido según cualquiera de los puntos 1-5, en el que los  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados presentes en la proteína o el polipéptido consisten en el  $V_{HH}$ , dominio  $V_{HH}$  humanizado o dominio  $V_H$  camelizado 12A2H1 (SEQ ID NO: 90).

50 7. La proteína o el polipéptido según cualquiera de los puntos 1-6, en el que dichos dos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados están directamente unidos entre sí o unidos entre sí por medio de un ligador, preferiblemente dicho ligador es una secuencia de aminoácidos, más preferiblemente dicho ligador comprende entre 1 y 40 residuos de aminoácido, tal como entre 2 y 30 residuos de aminoácido, preferiblemente en el que el ligador comprende o consiste esencialmente en residuos de glicina y serina; o en el que el ligador

55 comprende o consiste esencialmente en residuos de alanina.

8. Proteína o polipéptido elegido del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74-76, SEQ ID NO: 80-82 y SEQ ID NO: 98-106, preferiblemente el polipéptido de SEQ ID NO: 98.

60 9. La proteína o el polipéptido que consiste en SEQ ID NO: 98.

10. Secuencia de nucleótidos o ácido nucleico, que codifica una proteína o un polipéptido según cualquiera de los puntos anteriores.

65 11. Célula huésped, que comprende una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según el punto 10, o que expresa o que puede expresar una proteína o un polipéptido según cualquiera de los puntos 1-9.



12. Método para preparar una proteína o un polipéptido según cualquiera de los puntos 1-9, que comprende cultivar o mantener una célula huésped según el punto 11 en condiciones tales que dicha célula huésped produce o expresa una proteína o un polipéptido según cualquiera de los puntos 1-9; y que comprende opcionalmente además aislar la proteína o el polipéptido según cualquiera de los puntos 1-9.
13. Composición farmacéutica, que comprende al menos una proteína o un polipéptido según cualquiera de los puntos 1-9, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica según el punto 13, o proteína o polipéptido según cualquiera de los puntos 1-9, para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionado con la agregación mediada por plaquetas, elegido de trombo no oclusivo, la formación de un trombo oclusivo, formación de trombos arteriales, oclusión coronaria aguda, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis y trastornos que surgen de injerto de derivación coronaria, valvuloplastia de arterias coronarias e intervenciones coronarias tales como angioplastia, colocación de endoprótesis o aterectomía, hiperplasia tras angioplastia, aterectomía o colocación de endoprótesis arteriales, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de arterias enfermas, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), ataque isquémico cerebral transitorio y accidentes cerebrovasculares, angina de pecho estable o inestable, infarto cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomía carotídea, estenosis de arteria carótida, isquemia crítica de las extremidades, cardioembolia, enfermedad vascular periférica, reestenosis e infarto de miocardio y que contiene opcionalmente además una o más de otras sustancias activas para la prevención o el tratamiento de trastornos mediados por agregación, tales como aspirina (Aspegic), heparina, Plavix® y/o Reopro®.
15. Uso de una proteína o un polipéptido según cualquiera de los puntos 1-9, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionado con la agregación mediada por plaquetas, elegido de trombo no oclusivo, la formación de un trombo oclusivo, formación de trombos arteriales, oclusión coronaria aguda, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis y trastornos que surgen de injerto de derivación coronaria, valvuloplastia de arterias coronarias e intervenciones coronarias tales como angioplastia, colocación de endoprótesis o aterectomía, hiperplasia tras angioplastia, aterectomía o colocación de endoprótesis arteriales, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de arterias enfermas, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), ataque isquémico cerebral transitorio y accidentes cerebrovasculares, angina de pecho estable o inestable, infarto cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomía carotídea, estenosis de arteria carótida, isquemia crítica de las extremidades, cardioembolia, enfermedad vascular periférica, reestenosis e infarto de miocardio.

TABLA I: Combinaciones preferidas de CDR, de secuencias de CDR y región de entramado, y de CDR y FR humanizadas

| CLON  | I<br>D      | FR1                                    | I<br>D      | CDR1        |             | FR2                | I<br>D      | CDR1                  | I<br>D      | FR3                                  |             | CDR3                    | I<br>D      | FR4         |
|-------|-------------|----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|
| 12A5  | 1<br>2<br>2 | AVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCLASGRIFS | 1<br>4<br>8 | 1<br>IGAMG  | 1<br>7<br>4 | MYRQAPGK<br>QRELVA | 2<br>0<br>0 | TITSGGSTNY<br>ADPVKG  | 2<br>2<br>6 | RFTISRDPKNTVYLQ<br>MNSLKPEDTAVYYCYA  | 2<br>5<br>2 | NLKQGSYGYRFNDY          | 2<br>7<br>8 | WGQGTQVTVSS |
| 12B1  | 1<br>2<br>3 | QVQLVESGGG<br>LVQAGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>4<br>9 | 1<br>NYGMG  | 1<br>7<br>5 | WFRQAPGK<br>EREVLT | 2<br>0<br>1 | SISWSGTYT<br>AYSNDVKG | 2<br>2<br>7 | RFTISRDNKNTVYLQ<br>MDSLKPEDTAVYYCAA  | 2<br>5<br>3 | QSRYSNYYDHDDKY<br>AY    | 2<br>7<br>9 | WGQGTQVTVSS |
| 12B6  | 1<br>2<br>4 | QVQLVESGGG<br>LVQAGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>5<br>0 | 1<br>YNPMG  | 1<br>7<br>6 | WFRQAPGK<br>ERDVVA | 2<br>0<br>2 | AISRTGGST<br>YYARSVKG | 2<br>2<br>8 | RFTISRDNKRMVYLQ<br>MNALKPEDTAVYYCAA  | 2<br>5<br>4 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYNE | 2<br>8<br>0 | WGQGTQVTVSS |
| 12D11 | 1<br>2<br>5 | AVQLVDSGGG<br>LVQAGGSLRL<br>SCTASERTIF | 1<br>5<br>1 | 1<br>SSYTLG | 1<br>7<br>7 | WFRQAPGK<br>EREVVG | 2<br>0<br>3 | GISWSGVST<br>DYAEFAKG | 2<br>2<br>9 | RFTISRDAANTVYLEM<br>NSLKPEDTAVYYCAA  | 2<br>5<br>5 | LGRYSNWRNIGQYD<br>Y     | 2<br>8<br>1 | WGQGTQVTVSS |
| 12-E3 | 1<br>2<br>6 | EVQLVESGGG<br>LVQAGGSLRL<br>SCAASGRIFN | 1<br>5<br>2 | 1<br>NYGMG  | 1<br>7<br>8 | WFRQAPGK<br>EREVLT | 2<br>0<br>4 | SISWSGTYT<br>AYADNVKG | 2<br>3<br>0 | RFTISRDNKNTVYLQ<br>MDSLKPEDTAVYYCAA  | 2<br>5<br>6 | QSRYSNYYDHDDKY<br>AY    | 2<br>8<br>2 | WGQGTQVTVSS |
| 12C9  | 1<br>2<br>7 | AVQLVESGGG<br>LVQPGGSLKL<br>SCATSGSIFS | 1<br>5<br>3 | 1<br>SSAMA  | 1<br>7<br>9 | WYRQASGK<br>QRELVA | 2<br>0<br>5 | TITSGGRTSY<br>ADSVKG  | 2<br>3<br>1 | RFTISRDNKNTVYLQ<br>MNSLKPEDTAVYYDCNF | 2<br>5<br>7 | VVDGKRAP                | 2<br>8<br>3 | WGQGTQVTVSS |
| 14F8  | 1<br>2<br>8 | AVQLVESGGG<br>LVQAGESLRL<br>SCTSSGRAFS | 1<br>5<br>4 | 1<br>YYNTG  | 1<br>8<br>0 | WFRQAPGK<br>EREVVA | 2<br>0<br>6 | AISWSGGLT<br>YYADSVKG | 2<br>3<br>2 | RFTISRDNKDMVYLQ<br>MASLKPEDTAVYYCAA  | 2<br>5<br>8 | NRRQKTVQMGERAYD<br>Y    | 2<br>8<br>4 | WGQGTQVTVSS |
| 12B4  | 1<br>2<br>9 | QVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCLASGRIFS | 1<br>5<br>5 | 1<br>IGAMG  | 1<br>8<br>1 | LYRQAPGK<br>QRELVA | 2<br>0<br>7 | TITSGGSTNY<br>ADSVKG  | 2<br>3<br>3 | RFTISRDPKNTVYLQ<br>MNSLKPEDTAVYYCYA  | 2<br>5<br>9 | NLKQGSYGYRFN DY         | 2<br>8<br>5 | WGQGTQVTVSS |
| 12-E8 | 1<br>3<br>0 | AVQLEESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCLASGRIFS | 1<br>5<br>6 | 1<br>IGAMG  | 1<br>8<br>2 | LYRQAPGK<br>QRELVA | 2<br>0<br>8 | TITSGGSTNY<br>ADSVKG  | 2<br>3<br>4 | RFTISRDPKNTVYLQ<br>MNSLKPEDTAVYYCYA  | 2<br>6<br>0 | NLKQGDYGYRFN DY         | 2<br>8<br>6 | WGQGTQVTVSS |

|        |             |                                        |             |             |             |                    |             |                       |             |                                        |             |                         |             |             |
|--------|-------------|----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-----------------------|-------------|----------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|
| 12A6   | 1<br>3<br>1 | QVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCLASGRIFS | 1<br>5<br>7 | 1<br>IGTMG  | 1<br>8<br>3 | LYRQAPGK<br>QRELVA | 2<br>0<br>9 | TITSGGSTNY<br>ADSVKG  | 2<br>3<br>5 | RFTISRDKAKNTVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA  | 2<br>6<br>1 | NLKGQDYGVRFN DY         | 2<br>8<br>7 | WGQGTQVTVSS |
| 12D8   | 1<br>3<br>2 | AVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCLASGRIFS | 1<br>5<br>8 | 1<br>IGTMG  | 1<br>8<br>4 | LYRQAPGK<br>QRELVA | 2<br>1<br>0 | TITSGGSTNY<br>ADSVKG  | 2<br>3<br>6 | RFTISRDKAKNTVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA  | 2<br>6<br>2 | NLKGQDYGVRFN DY         | 2<br>8<br>8 | WGQGTQVTVSS |
| 12A2   | 1<br>3<br>3 | QVKLEESGGG<br>LVQAGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>5<br>9 | 1<br>YNPMG  | 1<br>8<br>5 | WFRQAPGK<br>ERDLVA | 2<br>1<br>1 | AISRTGGST<br>YYPDSVEG | 2<br>3<br>7 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>6<br>3 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYTF | 2<br>8<br>9 | WGQGTQVTVSS |
| 12F2   | 1<br>3<br>4 | QVKLVESGGG<br>LVQAGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>0 | 1<br>YNPMG  | 1<br>8<br>6 | WFRQAPGR<br>ERDVVA | 2<br>1<br>2 | AISRTGGST<br>YYPDSVEG | 2<br>3<br>8 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>6<br>4 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYTF | 2<br>9<br>0 | WGQGTQVTVSS |
| 14H10  | 1<br>3<br>5 | QVKLEESGGG<br>LVQAGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>1 | 1<br>YNPMG  | 1<br>8<br>7 | WFRQAPGK<br>ERDVVA | 2<br>1<br>3 | AISRTGGST<br>YYPDSVEG | 2<br>3<br>9 | RFTISRDNNAKRMVYLE<br>MNSLRPDDIATVYYCAA | 2<br>6<br>5 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYTF | 2<br>9<br>1 | WGQGTQVTVSS |
| 12B6H1 | 1<br>3<br>6 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>2 | 1<br>YNPMG  | 1<br>8<br>8 | WFRQAPGK<br>GRDVVA | 2<br>1<br>4 | AISRTGGST<br>YYARSVEG | 2<br>4<br>0 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>6<br>6 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYNF | 2<br>9<br>2 | WGQGTQVTVSS |
| 12B6H2 | 1<br>3<br>7 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>3 | 1<br>YNPMG  | 1<br>8<br>9 | WFRQAPGK<br>GREVVA | 2<br>1<br>5 | AISRTGGST<br>YYARSVEG | 2<br>4<br>1 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>6<br>7 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYNF | 2<br>9<br>3 | WGQGTQVTVSS |
| 12B6H3 | 1<br>3<br>8 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>4 | 1<br>YNPMG  | 1<br>9<br>0 | WFRQAPGK<br>GRDVVA | 2<br>1<br>6 | AISRTGGST<br>YYARSVEG | 2<br>4<br>2 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>6<br>8 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYNF | 2<br>9<br>4 | WGQGTQVTVSS |
| 12B6H4 | 1<br>3<br>9 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>5 | 1<br>YNP MG | 1<br>9<br>1 | WFRQAPGK<br>GRDVVA | 2<br>1<br>7 | AISRTGGST<br>YYARSVEG | 2<br>4<br>3 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>6<br>9 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYNF | 2<br>9<br>5 | WGQGTQVTVSS |
| 12A2H1 | 1<br>4<br>0 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>6 | 1<br>YNPMG  | 1<br>9<br>2 | WFRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>1<br>8 | AISRTGGST<br>YYPDSVEG | 2<br>4<br>4 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>7<br>0 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYTF | 2<br>9<br>6 | WGQGTQVTVSS |
| 12A2H3 | 1<br>4<br>1 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 1<br>6<br>7 | 1<br>YNPMG  | 1<br>9<br>3 | WFRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>1<br>9 | AISRTGGST<br>YYPDSVEG | 2<br>4<br>5 | RFTISRDNNAKRMVYLQ<br>MNSLRPEDIATVYYCAA | 2<br>7<br>1 | AGVRAEDGRVRTLPS<br>EYTF | 2<br>9<br>7 | WGQGTQVTVSS |

|         |             |                                        |             |       |             |                    |             |             |             |                                           |             |                             |             |             |
|---------|-------------|----------------------------------------|-------------|-------|-------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| 12A2H4  | 1<br>4<br>2 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRFES | 1<br>6<br>8 | YNPMG | 1<br>9<br>4 | WFRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>2<br>0 | 2<br>2<br>0 | 2<br>4<br>6 | RFTISRDN<br>AKRSVYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCAA  | 2<br>7<br>2 | AGVRAEDGRV<br>RTLPS<br>EYTF | 2<br>9<br>8 | WGQGTQVTVSS |
| 12A2H11 | 1<br>4<br>3 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRFES | 1<br>6<br>9 | YNPMG | 1<br>9<br>5 | WFRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>2<br>1 | 2<br>2<br>1 | 2<br>4<br>7 | RFTISRDN<br>AKRMVYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCAA  | 2<br>7<br>3 | AGVRAEDGRV<br>RTLPS<br>EYTF | 2<br>9<br>9 | WGQGTQVTVSS |
| 12A2H13 | 1<br>4<br>4 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRFES | 1<br>7<br>0 | YNPMG | 1<br>9<br>6 | WFRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>2<br>2 | 2<br>2<br>2 | 2<br>4<br>8 | RFTISRDN<br>AKNSVYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCAA  | 2<br>7<br>4 | AGVRAEDGRV<br>RTLPS<br>EYTF | 3<br>0<br>0 | WGQGTQVTVSS |
| 12A5H1  | 1<br>4<br>5 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRFES | 1<br>7<br>1 | IGAMG | 1<br>9<br>7 | MYRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>2<br>3 | 2<br>2<br>3 | 2<br>4<br>9 | RFTISRDN<br>GPKNTVYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCYA | 2<br>7<br>5 | NLKQGSYGYR<br>FNDY          | 3<br>0<br>1 | WGQGTQVTVSS |
| 12A5H2  | 1<br>4<br>6 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRFES | 1<br>7<br>2 | IGAMG | 1<br>9<br>8 | MYRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>2<br>4 | 2<br>2<br>4 | 2<br>5<br>0 | RFTISRDN<br>GAKNTVYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCYA | 2<br>7<br>6 | NLKQGSYGYR<br>FNDY          | 3<br>0<br>2 | WGQGTQVTVSS |
| 12A5H3  | 1<br>4<br>7 | EVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRL<br>SCAASGRFES | 1<br>7<br>3 | IGAMG | 1<br>9<br>9 | MYRQAPGK<br>GRELVA | 2<br>2<br>5 | 2<br>2<br>5 | 2<br>5<br>1 | RFTISRDN<br>AKNTVYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCYA  | 2<br>7<br>7 | NLKQGSYGYR<br>FNDY          | 3<br>0<br>3 | WGQGTQVTVSS |

Por tanto, en los Nanobodies de la descripción, al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I; o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de "identidad de secuencia" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I. En este contexto, por "elegida adecuadamente" quiere decirse que, según sea aplicable, una secuencia de CDR1 se elige de secuencias de CDR1 adecuadas (es decir, tal como se define en el presente documento), una secuencia de CDR2 se elige de secuencias de CDR2 adecuadas (es decir, tal como se define en el presente documento) y una secuencia de CDR3 se elige de secuencias de CDR3 adecuadas (es decir tal como se define en el presente documento), respectivamente.

En particular, en los Nanobodies de la descripción, al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR3 que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla I.

Preferiblemente, en los Nanobodies de la descripción, al menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I o del grupo que consiste en secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I.

En particular, en los Nanobodies de la descripción, al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR3 que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla I, respectivamente; y al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla I.

Lo más preferiblemente, en los Nanobodies de la descripción, las tres secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I.

Incluso más preferiblemente, en los Nanobodies de la descripción, al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I. Preferiblemente, en esta realización, al menos una o preferiblemente ambas de las otras dos secuencias de CDR presentes se eligen adecuadamente de secuencias de CDR que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR correspondientes, respectivamente, enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias correspondientes, respectivamente, enumeradas en la tabla I.

En particular, en los Nanobodies de la descripción, al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en las CDR3 enumeradas en la tabla I. Preferiblemente, en esta realización, al menos una y preferiblemente ambas de las secuencias de CDR1 y CDR2 presentes se eligen adecuadamente de

los grupos de secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla I.

Incluso más preferiblemente, en los Nanobodies de la descripción, al menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I. Preferiblemente, en esta realización, la secuencia de CDR restante presente se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR correspondientes enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias correspondientes enumeradas en la tabla I.

En particular, en los Nanobodies de la descripción, al menos la secuencia de CDR3 se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla I, y o bien la secuencia de CDR1 o bien la secuencia de CDR2 se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla I. Preferiblemente, en esta realización, la secuencia de CDR restante presente se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR correspondientes enumeradas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con las secuencias de CDR correspondientes enumeradas en la tabla I.

Incluso más preferiblemente, en los Nanobodies de la descripción, las tres secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I.

Además, generalmente, se prefieren las combinaciones de CDR enumeradas en la tabla I (es decir, las mencionadas en la misma línea en la tabla I). Por tanto, se prefiere generalmente que, cuando una CDR en un Nanobody de la descripción es una secuencia de CDR mencionada en la tabla I o se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de CDR enumerada en la tabla I; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con una secuencia de CDR enumerada en la tabla I, que al menos una y preferiblemente ambas de las otras CDR se elijan adecuadamente de las secuencias de CDR que pertenecen a la misma combinación en la tabla I (es decir, mencionadas en la misma línea en la tabla I) o se elijan adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con la(s) secuencia(s) de CDR que pertenece(n) a la misma combinación y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la(s) secuencia(s) de CDR que pertenece(n) a la misma combinación. Las otras preferencias indicadas en los párrafos anteriores también se aplican a las combinaciones de CDR mencionadas en la tabla I.

Por tanto, por medio de ejemplos no limitativos, un Nanobody de la descripción puede comprender por ejemplo una secuencia de CDR1 que tiene más del 80 % identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla I, una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencia de aminoácido con una de las secuencias de CDR2 mencionadas en la tabla I (pero que pertenece a una combinación diferente), y una secuencia de CDR3.

Algunos Nanobodies preferidos de la descripción pueden comprender por ejemplo: (1) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla I; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencia de aminoácido con una de las secuencias de CDR2 mencionadas en la tabla I (pero que pertenece a una combinación diferente); y una secuencia de CDR3 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR3 mencionadas en la tabla I (pero que pertenece a una combinación diferente); o (2) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla I; una secuencia de CDR2 y una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla I; o (3) una secuencia de CDR1; una secuencia de CDR2 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con una de la secuencia de CDR2 enumeradas en la tabla I; y una secuencia de CDR3 que tiene 3, 2 o 1 diferencias de aminoácido con la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación que la secuencia de CDR2.

Algunos Nanobodies particularmente preferidos de la descripción pueden comprender por ejemplo: (1) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla I; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de

CDR2 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; y una secuencia de CDR3 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; (2) una secuencia de CDR1; una CDR2 enumerada en la tabla I y una secuencia de CDR3 enumeradas en la tabla I (en la que la secuencia de CDR2 y la secuencia de CDR3 pueden pertenecer a combinaciones diferentes).

Algunos Nanobodies incluso más preferidos de la descripción pueden comprender por ejemplo: (1) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla I; la secuencia de CDR2 enumerada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; y una secuencia de CDR3 mencionada en la tabla I que pertenece a una combinación diferente; o (2) una secuencia de CDR1 mencionada en la tabla I; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencias de aminoácido con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; y más del 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de CDR3 enumerada en la tabla I que pertenece a la misma combinación diferente.

Nanobodies particularmente preferidos de la descripción pueden comprender por ejemplo una secuencia de CDR1 mencionada en la tabla I, una secuencia de CDR2 que tiene más del 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; y la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma.

En los Nanobodies más preferidos de la descripción, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente de una de las combinaciones de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla I.

Preferiblemente, cuando una secuencia de CDR se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de CDR enumeradas en la tabla I; y/o cuando una secuencia de CDR se elige adecuadamente del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con una de las secuencias de CDR enumeradas en la tabla I:

i) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

ii) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia de CDR enumerada en la tabla I.

Según una realización no limitativa pero preferida de la descripción, las secuencias de CDR en los Nanobodies de la descripción son tal como se definieron anteriormente y son también tales que el Nanobody de la descripción se une a vWF con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos, y preferiblemente de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos y más preferiblemente de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M), y/o con una constante de asociación ( $K_A$ ) de al menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>, preferiblemente al menos  $10^8$  M<sup>-1</sup>, más preferiblemente al menos  $10^9$  M<sup>-1</sup>, tal como al menos  $10^{12}$  M<sup>-1</sup>; y en particular con una  $K_D$  menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. Los valores de  $K_D$  y  $K_A$  del Nanobody de la descripción contra vWF pueden determinarse de una manera conocida *per se*, por ejemplo usando el ensayo descrito en el presente documento. Más generalmente, los Nanobodies descritos en el presente documento tienen preferiblemente una constante de disociación con respecto a vWF que es tal como se describe en este párrafo.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un Nanobody con una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60 a 73 y SEQ ID NO: 86 a 97 o del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que tienen más del 80 %, preferiblemente más del 90 %, más preferiblemente más del 95 %, tal como el 99 % o más de "identidad de secuencia" (tal como se define en el presente documento) con una o más de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 a 73 y SEQ ID NO: 86 a 97, secuencias de aminoácidos que lo más preferiblemente tienen secuencias de región de entramado que son tal como se definen adicionalmente más adelante bajo la descripción general de las secuencias de región de entramado de Nanobodies.

Según una realización específica, pero no limitativa, estas últimas secuencias de aminoácidos se han "humanizado", tal como se describe adicionalmente a continuación.

Lo más preferiblemente, los Nanobodies de la descripción se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60 a 73 y SEQ ID NO: 86 a 97, de los cuales los Nanobodies "humanizados" de SEQ ID NO: 86 a 97 pueden preferirse particularmente.

Nanobodies que se prefieren particularmente según la invención son el Nanobody 12B6 (SEQ ID NO: 62) y homólogos y variantes del mismo, y en particular variantes humanizadas del mismo. Algunos homólogos particularmente preferidos, pero no limitativos y variantes (humanizadas) son por ejemplo los Nanobodies 12A2 (SEQ ID NO: 71); 12F2 (SEQ ID NO: 72); 14H10 (SEQ ID NO: 73) y variantes humanizadas de los mismos, tales

como 12B6H1 (SEQ ID NO: 86); 12B6H2 (SEQ ID NO: 87); 12B6H3 (SEQ ID NO: 88); 12B6H4 (SEQ ID NO: 89); 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

Se prefiere particularmente en la invención el Nanobody 12A2 (SEQ ID NO: 71) y homólogos y variantes del mismo, y en particular variantes humanizadas del mismo. Algunos homólogos particularmente preferidos, pero no limitativos y variantes (humanizadas) son por ejemplo los Nanobodies 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y 12A2H13 (SEQ ID NO: 94), de los cuales el Nanobody 12A2H1 (SEQ ID NO: 90) se prefiere particularmente.

Por tanto, un aspecto preferido pero no limitativo de la invención se refiere a un Nanobody contra factor de von Willebrand (vWF), consistiendo dicho Nanobody en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

a) CDR1 comprende o consiste en:

- la secuencia de aminoácidos YNPMG;

y

b) CDR2 comprende o consiste en:

- la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

y

c) CDR3 comprende o consiste en:

- la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

En particular, la descripción se refiere a un Nanobody de este tipo, en el que:

- CDR1 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YNPMG;

o en el que:

- CDR2 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

o en el que

- CDR3 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

Por ejemplo, la invención se refiere a tales Nanobodies, en los que:

- CDR1 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YNPMG; y CDR3 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF;

o en los que:

- CDR1 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YNPMG; y CDR2 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

o en los que:

- CDR2 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; y CDR3 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

En un aspecto, la descripción se refiere a un Nanobody de este tipo, en el que CDR1 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos YNPMG; y CDR3 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

La invención también se refiere a variantes humanizadas de un Nanobody de este tipo. Algunas sustituciones preferidas, pero no limitativas se describirán en el presente documento, o quedarán claras para el experto comparando los Nanobodies no humanizados y humanizados correspondientes divulgados en el presente documento. Algunas sustituciones humanizantes particularmente útiles son una o más de las presentes en las variantes humanizadas de 12A2 (tal como quedará claro para el experto a partir de una comparación de las



secuencias de 12A2H1 (SEQ ID NO: 90) con las secuencias humanizadas correspondientes de 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

Otro aspecto preferido pero no limitativo de la invención se refiere a un Nanobody contra factor de von Willebrand (vWF), consistiendo dicho Nanobody en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

d) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácidos YNPMG;

y

e) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

y

f) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

En particular, la descripción se refiere a un Nanobody de este tipo, en el que:

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos YNPMG;

o en el que:

- CDR2 es la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

o en el que

- CDR3 es la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

Por ejemplo, la invención se refiere a tales Nanobodies, en los que:

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos YNPMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF;

o en los que:

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos YNPMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

o en los que:

- CDR2 es la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

En un aspecto, la invención se refiere a un Nanobody de este tipo, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos YNPMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF.

La invención también se refiere a variantes humanizadas de un Nanobody de este tipo. Algunas sustituciones humanizantes preferidas, pero no limitativas se describirán en el presente documento, o quedarán claras para el experto comparando los Nanobodies no humanizados y humanizados correspondientes divulgados en el presente documento. Algunas sustituciones humanizantes particularmente útiles son una o más de las presentes en las variantes humanizadas de 12A2 (tal como quedará claro para el experto a partir de una comparación de las secuencias de 12A2H1 (SEQ ID NO: 90) con las secuencias humanizadas correspondientes de 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

Los Nanobodies descritos en el presente documento pueden ser Nanobodies de la clase GLEW, Nanobodies de la clase "103 P, R o S" o "Nanobodies de la clase KERE" (todos tal como se describen en el presente documento). En particular, los Nanobodies descritos en el presente documento pueden ser Nanobodies de la clase KERE, aunque la invención no se limita a los mismos.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un Nanobody que tiene al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos uno de los Nanobodies del grupo que consiste en SEQ ID NO 60-73 y SEQ ID NO 86-97.

En particular, la descripción se refiere a un Nanobody que tiene al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos uno de los Nanobodies 12B6 (SEQ ID NO: 62); 12A2 (SEQ ID NO: 71); 12F2 (SEQ ID NO: 72); 14H10 (SEQ ID NO: 73); 12B6H1 (SEQ ID NO: 86); 12B6H2 (SEQ ID NO: 87); 12B6H3 (SEQ ID NO: 88); 12B6H4 (SEQ ID NO: 89); 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y/o 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

Más en particular, la descripción se refiere a un Nanobody que tiene al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos uno de los Nanobodies 12A2 (SEQ ID NO: 71); 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y/o 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

Incluso más en particular, la descripción se refiere a un Nanobody que tiene al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 99 % identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con el Nanobody 12A2H1 (SEQ ID NO: 90).

La invención también se refiere a variantes humanizadas de tales Nanobodies. Algunas sustituciones humanizantes preferidas, pero no limitativas se describirán en el presente documento, o quedarán claras para el experto comparando los Nanobodies no humanizados y humanizados correspondientes divulgados en el presente documento. Algunas sustituciones humanizantes particularmente útiles son una o más de las presentes en las variantes humanizadas de 12A2 (tal como quedará claro para el experto a partir de una comparación de las secuencias de 12A2H1 (SEQ ID NO: 90) con las secuencias humanizadas correspondientes de 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

La descripción también se refiere a un Nanobody que se elige del grupo que consiste en los Nanobodies de SEQ ID NO 60-73 y SEQ ID NO 86-97.

En particular, la invención se refiere a un Nanobody que se elige del grupo que consiste en los Nanobodies 12B6 (SEQ ID NO: 62); 12A2 (SEQ ID NO: 71); 12F2 (SEQ ID NO: 72); 14H10 (SEQ ID NO: 73); 12B6H1 (SEQ ID NO: 86); 12B6H2 (SEQ ID NO: 87); 12B6H3 (SEQ ID NO: 88); 12B6H4 (SEQ ID NO: 89); 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y/o 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).

Más en particular, la invención se refiere a un Nanobody que se elige del grupo que consiste en los Nanobodies 12A2 (SEQ ID NO: 71); 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y/o 12A2H13 (SEQ ID NO: 94). Un Nanobody particularmente útil es el Nanobody 12A2H1 (SEQ ID NO: 90).

Los Nanobodies descritos en el presente documento preferiblemente tienen secuencias de región de entramado que son tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Algunas secuencias de región de entramado particularmente preferidas (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente) son las del Nanobody 12A2 y sus variantes humanizadas; y secuencias de región de entramado que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de región de entramado; y y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de región de entramado (en las que cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o en las que dicha secuencia de aminoácidos contiene preferiblemente sustituciones de aminoácidos y no más de 3 delecciones de aminoácidos o no más de 3 inserciones de aminoácidos). Nanobodies contra vWF con tales secuencias de región de entramado forman un aspecto adicional de la invención.

En particular, la invención se refiere a un Nanobody contra vWF, en el que FR1 es SEQ ID NO: 140; FR2 es SEQ ID NO: 192; FR3 es SEQ ID 244; y FR4 es SEQ ID NO: 296; o secuencias de región de entramado que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de región de entramado; y y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de región de entramado (en las que cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o en las que dicha secuencia de aminoácidos contiene preferiblemente sustituciones de aminoácidos y no más de 3 delecciones de aminoácidos o no más de 3 inserciones de aminoácidos).

Más en particular, la invención se refiere a un Nanobody contra vWF, en el que FR1 es SEQ ID NO: 140; FR2 es SEQ ID NO: 192; FR3 es SEQ ID 244; y FR4 es SEQ ID NO: 296.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanobody contra vWF tal como se define en el presente documento. Tales polipéptidos se denominan también en el presente documento “polipéptidos de la invención” y pueden ser tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento y/o tal como se describe generalmente en el documento WO 02/062551 para los Nanobodies divulgados en el mismo, y pueden ser por ejemplo polipéptidos multivalentes o polipéptidos multiespecíficos, de nuevo tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento.

Preferiblemente, un polipéptido de la invención es o bien bivalente o bien trivalente (es decir, que comprende dos o tres Nanobodies de la invención, respectivamente, opcionalmente unidos por medio de uno o dos ligadores tal como se define en el presente documento, respectivamente) o un polipéptido multiespecífico, que comprende uno o dos, y preferiblemente dos, Nanobodies de la invención y al menos un Nanobody dirigido contra una proteína sérica, y en particular contra una proteína sérica humana, tal como contra albúmina sérica humana.

En unas realizaciones preferidas, pero no limitativas, los Nanobodies de la descripción presentes en los polipéptidos de la descripción se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60 a 73 y SEQ ID NO: 86 a 97, y en particular de los Nanobodies “humanizados” de SEQ ID NO 86 a 97. Los Nanobodies contra albúmina sérica humana presentes en los polipéptidos de la invención son preferiblemente tal como se define en el presente documento, y se eligen más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107 a 121, y en particular de los Nanobodies “humanizados” contra albúmina sérica humana de SEQ ID NO 114-121.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de polipéptidos de la descripción son los polipéptidos de SEQ ID NO: 74 a 82 y los polipéptidos de SEQ ID NO 98-106. Otros polipéptidos de la descripción pueden elegirse por ejemplo del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen más del 80 %, preferiblemente más del 90 %, más preferiblemente más del 95 %, tal como el 99 % o más de “identidad de secuencia” (tal como se define en el presente documento) con una o más de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 a 82 y/o SEQ ID NO 98 a 106, en los que los Nanobodies comprendidos dentro de dichas secuencias de aminoácidos son preferiblemente tal como se define en el presente documento.

Según un aspecto de la invención, los Nanobodies, las proteínas y los polipéptidos descritos en el presente documento no tienen esencialmente influencia sobre la escisión de ULvWF por ADAMTS-13. En particular, cuando los Nanobodies, las proteínas y los polipéptidos descritos en el presente documento se usan a las dosis descritas en el presente documento, la escisión de ULvWF por ADAMTS-13 (o bien *in vivo* tras la administración y/o bien tal como se mide usando un ensayo adecuado, tal como el ensayo descrito en el presente documento), esencialmente no reduce ni inhibe la escisión de ULvWF por ADAMTS-13, es decir en no más del 50 %, preferiblemente no más del 20 %, incluso más preferiblemente no más del 10 %, tal como menos del 5 % o esencialmente en absoluto). Por tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un Nanobody, una proteína o un polipéptido, y en particular a un Nanobody, una proteína o un polipéptido tal como se describe en el presente documento, que esencialmente no reduce ni inhibe la escisión de ULvWF por ADAMTS-13.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un Nanobody de la invención y/o un polipéptido de la invención. Un ácido nucleico de este tipo se denominará a continuación “ácido nucleico de la invención” y puede estar por ejemplo en forma de un constructo genético, tal como se define en el presente documento.

En otro aspecto, la invención se refiere un huésped o célula huésped que expresa o es capaz de expresar un Nanobody de la invención y/o un polipéptido de la invención; y/o que contiene un ácido nucleico que codifica un Nanobody de la invención y/o un polipéptido de la invención. Un huésped o una célula huésped de este tipo puede ser también análogo a los huéspedes y células huésped descritos en el documento WO 02/062551, pero que expresa o puede expresar un Nanobody de la invención y/o un polipéptido de la invención y/o que contiene un ácido nucleico tal como se describe en el presente documento.

La invención se refiere además a un producto o composición que contiene o que comprende un Nanobody de la invención, un polipéptido de la invención; y/o un ácido nucleico de la invención. Un producto o una composición de este tipo puede ser por ejemplo una composición farmacéutica (tal como se describe a continuación) o un producto o una composición para uso de diagnóstico (tal como se describe también a continuación). Un producto o una composición de este tipo pueden ser también análogos a los productos y las composiciones descritos en el documento WO 02/062551, pero que contienen o que comprenden un Nanobody de la invención, un polipéptido de la invención o un ácido nucleico de la invención.

La invención se refiere además a métodos para preparar o generar los Nanobodies, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones tal como se describe en el presente documento, métodos que son tal como se describe adicionalmente a continuación. Además, generalmente, los Nanobodies, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento pueden prepararse y usarse también de una manera análoga a la manera descrita en el documento WO 02/062551.

La invención se refiere además a aplicaciones y usos de los Nanobodies, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones anteriores descritos en el presente documento, aplicaciones y usos que incluyen, pero no se limitan a las aplicaciones y usos descritos a continuación en el presente documento y/o los usos y aplicaciones adicionales para Nanobodies contra vWF y/o para polipéptidos que contienen los mismos en el documento WO 02/062551.

Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención quedarán claros a partir de la descripción adicional a continuación en el presente documento.

## Descripción detallada de la invención

Los aspectos y realizaciones anteriores y otros de la invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción a continuación en el presente documento, en la que:

a) A menos que se indique o se defina otra cosa, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que quedará claro para el experto. Se hace referencia por ejemplo a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.<sup>a</sup> ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Roitt *et al.*, "Immunology" (6.<sup>a</sup> Ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6.<sup>a</sup> ed.), Garland Science Publishing/ Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente;

b) A menos que se indique otra cosa, el término "*secuencia de inmunoglobulina*", ya se use en el presente documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, se usa como término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como partes, dominios o fragmentos del mismo (incluyendo pero sin limitarse a fragmentos o dominios de unión a antígeno tales como dominios  $V_{HH}$  o dominios  $V_H/V_L$ , respectivamente). Además, el término "*secuencia*" tal como se usa en el presente documento (por ejemplo en términos como "*secuencia de inmunoglobulina*", "*secuencia de anticuerpo*", "*secuencia de dominio variable*", "*secuencia de  $V_{HH}$* " o "*secuencia de proteína*"), debe entenderse generalmente que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante así como secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican el mismo, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada;

c) a menos que se indique otra cosa, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describan específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se*, tal como quedará claro para el experto. Se hace referencia de nuevo por ejemplo a los manuales convencionales, a los antecedentes generales de la técnica a los que se hizo referencia anteriormente y a las referencias adicionales mencionadas en el mismo;

d) los residuos de aminoácido se indicarán según el código de aminoácidos de tres letras o de una letra convencional, tal como se menciona en la tabla 1;

Tabla 1: Código de aminoácidos de una letra y tres letras

|                                                    |                          |     |   |
|----------------------------------------------------|--------------------------|-----|---|
| Apolar, no cargado (a pH 6,0 - 7,0) <sup>(3)</sup> | Alanina                  | Ala | A |
|                                                    | Valina                   | Val | V |
|                                                    | Leucina                  | Leu | L |
|                                                    | Isoleucina               | Ile | I |
|                                                    | Fenilalanina             | Phe | F |
|                                                    | Metionina <sup>(1)</sup> | Met | M |
|                                                    | Triptófano               | Trp | W |
|                                                    | Prolina                  | Pro | P |
| Polar, no cargado (a pH 6,0-7,0)                   | Glicina <sup>(2)</sup>   | Gly | G |
|                                                    | Serina                   | Ser | S |
|                                                    | Treonina                 | Thr | T |
|                                                    | Cisteína                 | Cys | C |
|                                                    | Asparagina               | Asn | N |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                          |     |   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----|---|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Glutamina                | Gln | Q |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Tirosina                 | Tyr | Y |
| Polar, cargado (a pH 6,0-7,0)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Lisina                   | Lys | K |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Arginina                 | Arg | R |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Histidina <sup>(4)</sup> | His | H |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Aspartato                | Asp | D |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Glutamato                | Glu | E |
| Notas:<br>(1) Algunas veces también se considera que es un aminoácido no cargado polar.<br>(2) Algunas veces también se considera que es un aminoácido no cargado apolar.<br>(3) Tal como quedará claro para el experto, el hecho de que un residuo de aminoácido se denomine en esta tabla como o bien cargado o bien no cargado a pH de 6,0 a 7,0 no refleja de ningún modo la carga que dicho residuo de aminoácido puede tener a un pH inferior a 6,0 y/o a un pH superior a 7,0; los residuos de aminoácido mencionados en la tabla pueden estar o bien cargados y/o bien no cargados a un pH superior o inferior de este tipo, tal como quedará claro para el experto.<br>(4) Tal como se conoce en la técnica, la carga de un residuo de His depende enormemente de incluso pequeños desplazamientos en el pH, pero un residuo de His puede considerarse generalmente no cargado esencialmente a un pH de aproximadamente 6,5. |                          |     |   |

e) Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de “*identidad de secuencia*” entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos puede calcularse dividiendo [el número de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos] entre [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos] y multiplicando por [100 %], en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos, en comparación con la primera secuencia de nucleótidos, se considera como una diferencia en un único nucleótido (posición).

Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos puede calcularse usando un algoritmo informático conocido para la alineación de secuencias tal como NCBI Blast v2.0, usando parámetros convencionales.

Algunas otras técnicas, algoritmos informáticos y parámetros para determinar el grado de identidad de secuencia se describen por ejemplo en los documentos WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 y GB 2 357 768-A.

Habitualmente, para el propósito de determinar el porcentaje de “*identidad de secuencia*” entre dos secuencias de nucleótidos según el método de cálculo explicado de manera resumida anteriormente en el presente documento, la secuencia de nucleótidos con el mayor número de nucleótidos se tomará como la “primera” secuencia de nucleótidos, y la otra secuencia de nucleótidos se tomará como la “segunda” secuencia de nucleótidos;

f) Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de “*identidad de secuencia*” entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos puede calcularse dividiendo [el número de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos] entre [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicando por [100 %], en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la primera secuencia de aminoácidos, se considera como una diferencia en un único residuo de aminoácido (posición), es decir como una “*diferencia de aminoácido*” tal como se define en el presente documento.

Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede calcularse usando un algoritmo informático conocido, tal como los mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad de secuencia para secuencias de nucleótidos, de nuevo usando parámetros convencionales.

Habitualmente, para el propósito de determinar el porcentaje de “*identidad de secuencia*” entre dos secuencias de aminoácidos según el método de cálculo explicado de manera resumida anteriormente en el presente documento, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos de aminoácido se tomará como la “primera” secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la “segunda” secuencia de aminoácidos.

Además, en la determinación del grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, el experto puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos “conservativas”, que pueden describirse generalmente como sustituciones de aminoácidos en las que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones de aminoácidos conservativas se conocen bien en la técnica, por ejemplo de los documentos WO 04/037999, GB-A-2 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y pueden seleccionarse tipos y/o combinaciones (preferidos) de tales sustituciones basándose en las enseñanzas pertinentes del documento WO 04/037999 así como del documento WO 98/49185 y de las referencias adicionales mencionadas en los mismos.

Tales sustituciones conservativas son preferiblemente sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) se sustituye por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) residuos alifáticos pequeños, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares, cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) residuos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

Sustituciones conservativas particularmente preferidas son las siguientes: Ala a Gly o a Ser; Arg a Lys; Asn a Gln o a His; Asp a Glu; Cys a Ser; Gln a Asn; Glu a Asp; Gly a Ala o a Pro; His a Asn o a Gln; Ile a Leu o a Val; Leu a Ile o a Val; Lys a Arg, a Gln o a Glu; Met a Leu, a Tyr o a Ile; Phe a Met, a Leu o a Tyr; Ser a Thr; Thr a Ser; Trp a Tyr; Tyr a Trp; y/o Phe a Val, a Ile o a Leu.

Cualquier sustitución de aminoácido aplicada a los polipéptidos descritos en el presente documento puede basarse también en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrollado por Schulz *et al.*, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de potenciales de formación de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978 y en el análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollado por Eisenberg *et al.*, Proc. Nad. Acad. Sci. EE. UU. 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle, J Molec. Biol. 157: 105-132, 1981, y Goldman *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986. Información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de Nanobodies facilitada en la descripción a continuación y en los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente. Además, para este propósito, la estructura cristalina de un dominio V<sub>HH</sub> de una llama la facilitan, por ejemplo, Desmyter *et al.*, Nature Structural Biology, vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli *et al.*, Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; y Decanniere *et al.*, Structure, vol. 7, 4, 361 (1999);

g) se dice que secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos son “*exactamente iguales*” si tienen el 100 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) a lo largo de toda su longitud;

h) cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término “*diferencia de aminoácido*” se refiere a una inserción, delección o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia, en comparación con la segunda secuencia; se entiende que dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o más de tales diferencias de aminoácidos;

i) una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos se considera que está “*(en) (forma) esencialmente aislada*”, por ejemplo, en comparación con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo del que se ha obtenido, cuando se ha separado de al menos otro componente con el que está asociado habitualmente en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente minoritario. En particular, una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos se considera “*esencialmente aislada*” cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces y hasta 1000 veces o más. Una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos que está “*en forma esencialmente aislada*” es preferiblemente esencialmente homogénea, tal como se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida;

j) el término “dominio” tal como se usa en el presente documento se refiere generalmente a una región globular de una cadena de anticuerpo, y en particular a una región globular de un anticuerpo de cadena pesada, o a un polipéptido que consiste esencialmente en una región globular de este tipo. Habitualmente, un dominio de este tipo comprenderá bucles peptídicos (por ejemplo 3 o 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, como una lámina o mediante enlaces disulfuro.

k) El término ‘determinante antigénico’ se refiere al epítipo en el antígeno reconocido por la molécula de unión a antígeno (tal como un Nanobody o un polipéptido de la invención) y más en particular por el sitio de unión a antígeno de dicha molécula. Los términos “determinante antigénico” y “epítipo” pueden usarse también de manera intercambiable en el presente documento.

l) Una secuencia de aminoácidos (tal como un Nanobody, un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o generalmente un polipéptido o proteína de unión a antígeno o un fragmento del mismo) que puede unirse a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína

específicos (o por al menos una parte, fragmento o epítipo del mismo) se dice que es “contra” o está “dirigido contra” dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

m) El término “especificidad” se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinante antigénicos a los que una molécula de unión a antígeno o molécula de proteína de unión a antígeno particular (tal como un Nanobody o un polipéptido de la invención) puede unirse. La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en la afinidad y/o aidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (KD), es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor es el valor de la KD, más fuerte es la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión a antígeno (alternativamente, la afinidad puede expresarse también como la constante de afinidad (KA), que es 1/KD). Tal como quedará claro para el experto (por ejemplo basándose en la divulgación adicional en el presente documento), la afinidad puede determinarse de una manera conocida *per se*, dependiendo del antígeno de interés específico. La aidez es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un Nanobody o polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente. La aidez se refiere a tanto la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno como al número de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión a antígeno. Normalmente, las proteínas de unión a antígeno (tales como los Nanobodies y/o polipéptidos de la invención) se unirán con una constante de disociación (KD) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos, y preferiblemente de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos y más preferiblemente de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro, y/o con una constante de asociación (KA) de al menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>, preferiblemente al menos  $10^8$  M<sup>-1</sup>, más preferiblemente al menos  $10^9$  M<sup>-1</sup>, tal como al menos  $10^{12}$  M<sup>-1</sup>. Cualquier valor de KD mayor de  $10^{-4}$  M se considera generalmente que indica unión inespecífica. Preferiblemente, un Nanobody o polipéptido de la invención se unirá al antígeno deseado con una KD menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas *per se* en la técnica.

n) Tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento, la secuencia de aminoácidos y estructura de un Nanobody puede considerarse, sin embargo sin limitarse a lo mismo, que está compuesta por cuatro regiones de entramado o “FR”, que se denominan en la técnica y a continuación en el presente documento “región de entramado 1” o “FR1”; “región de entramado 2” o “FR2”; “región de entramado 3” o “FR3”; y “región de entramado 4” o “FR4”, respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o “CDR”, que se denominan en la técnica “región determinante de complementariedad 1” o “CDR1”; “región determinante de complementariedad 2” o “CDR2”; y “región determinante de complementariedad 3” o “CDR3”, respectivamente;

o) tal como se describe también adicionalmente a continuación en el presente documento, el número total de residuos de aminoácido en un Nanobody puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente 112-115, y es lo más preferiblemente 113. Sin embargo, debe indicarse que partes, fragmentos o análogos (tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento) de un Nanobody no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos o análogos cumplan los requisitos adicionales explicados resumidamente a continuación en el presente documento y sean también preferiblemente adecuados para los propósitos descritos en el presente documento;

p) los residuos de aminoácido de un Nanobody se numeran según la numeración general para dominios V<sub>H</sub> facilitada por Kabat *et al.* (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), tal como se aplica a dominios V<sub>HH</sub> de camélidos en el artículo de Riechmann y Muildermans, al que se hizo referencia anteriormente (véase por ejemplo la figura 2 de dicha referencia). Según esta numeración, el FR1 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 1-30, la CDR1 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-36, la FR2 de un Nanobody comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, FR3 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 66-94, la CDR3 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102 y la FR4 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 103-113. [En este sentido, debe indicarse que, tal como se conoce bien en la técnica para dominios V<sub>H</sub> y para dominios V<sub>HH</sub>, el número total de residuos de aminoácido en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácido indicado por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácido que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácido en la secuencia real. Generalmente, sin embargo, puede decirse que, según la numeración de Kabat e independientemente del número de residuos de aminoácido en las CDR, la posición 1 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR1 y viceversa, la posición 36 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR2 y viceversa, la posición 66 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR3 y viceversa, y la posición 103 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de

FR4 y viceversa].

Métodos alternativos para numerar los residuos de aminoácido de dominios  $V_H$ , métodos que también pueden aplicarse de una manera análoga a dominios  $V_{HH}$  de camélidos y a Nanobodies, son el método descrito por Chothia *et al.* (Nature 342, 877-883 (1989)), la denominada "definición de AcM" y la denominada "definición de contacto". Sin embargo, en las presentes descripción, reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración según Kabat tal como la aplican a dominios  $V_{HH}$  Riechmann y Muyltermans, a menos que se indique otra cosa; y

q) las figuras, lista de secuencias y la parte experimental/ejemplos se facilitan solo para ilustrar adicionalmente la invención y no deben interpretarse o considerarse como limitativos del alcance de la invención y/o de las reivindicaciones adjuntas de ningún modo, a menos que se indique explícitamente otra cosa en el presente documento.

Para una descripción general de anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables de los mismos, se hace referencia entre otras a las siguientes referencias, que se mencionan como antecedentes generales de la técnica: documentos WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; documentos WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); documento WO 03/050531 de Algonomics N.V. y el solicitante; documento WO 01/90190 del National Research Council of Canada; el documento WO 03/025020 (= EP 1 433 793) del Institute of Antibodies; así como los documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 por el solicitante y las solicitudes de patente publicadas adicionales por el solicitante; Hamers-Casterman *et al.*, Nature 3 de junio de 1993; 363 (6428): 446-8; Davies y Riechmann, FEBS Lett. 21 de febrero de 1994; 339(3): 285-90; Muyltermans *et al.*, Protein Eng. Septiembre de 1994; 7(9): 1129-3; Davies y Riechmann, Biotechnology (NY) mayo de 1995; 13(5): 475-9; Gharoudi *et al.*, 9th Forum of Applied Biotechnology, Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 1995; 60/4a part I: 2097-2100; Davies y Riechmann, Protein Eng. Junio de 1996; 9(6): 531-7; Desmyter *et al.*, Nat Struct Biol. Septiembre de 1996; 3(9): 803-11; Sheriff *et al.*, Nat Struct Biol. Septiembre de 1996; 3(9): 733-6; Spinelli *et al.*, Nat Struct Biol. Septiembre de 1996; 3(9): 752-7; Arbabi Ghahroudi *et al.*, FEBS Lett. 15 de septiembre de 1997; 414(3): 521-6; Vu *et al.*, Mol Immunol. Noviembre-diciembre de 1997; 34(16-17): 1121-31; Atarhouch *et al.*, Journal of Camel Practice and Research 1997; 4: 177-182; Nguyen *et al.*, J. Mol. Biol. 23 de enero de 1998; 275(3): 413-8; Lauwereys *et al.*, EMBO J. 1 de julio de 1998; 17(13): 3512-20; Frenken *et al.*, Res Immunol. Julio-agosto de 1998; 149(6):589-99; Transue *et al.*, Proteins 1 de septiembre de 1998; 32(4): 515-22; Muyltermans y Lauwereys, J. Mol. Recognit. Marzo-abril de 1999; 12 (2): 131-40; van der Linden *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 12 de abril de 1999; 1431(1): 37-46.; Decanniere *et al.*, Structure Fold. Des. 15 de abril de 1999; 7(4): 361-70; Nguyen *et al.*, Mol. Immunol. Junio de 1999; 36(8): 515-24; Woolven *et al.*, Immunogenetics octubre de 1999; 50 (1-2): 98-101; Riechmann y Muyltermans, J. Immunol. Methods 10 de diciembre de 1999; 231 (1-2): 25-38; Spinelli *et al.*, Biochemistry 15 de febrero de 2000; 39(6): 1217-22; Frenken *et al.*, J. Biotechnol. 28 de febrero de 2000; 78(1): 11-21; Nguyen *et al.*, EMBO J. 1 de marzo de 2000; 19(5): 921-30; van der Linden *et al.*, J. Immunol. Methods 23 de junio de 2000; 240 (1-2): 185-95; Decanniere *et al.*, J. Mol. Biol. 30 de junio de 2000; 300 (1): 83-91; van der Linden *et al.*, J. Biotechnol. 14 de julio de 2000; 80(3): 261-70; Harmsen *et al.*, Mol. Immunol. Agosto de 2000; 37(10): 579-90; Perez *et al.*, Biochemistry 9 de enero de 2001; 40(1): 74-83; Conrath *et al.*, J. Biol. Chem. 9 de marzo de 2001; 276 (10): 7346-50; Muyltermans *et al.*, Trends Biochem Sci. Abril de 2001; 26(4):230-5; Muyltermans S., J. Biotechnol. Junio de 2001; 74 (4): 277-302; Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 13 de julio de 2001; 276 (28): 26285-90; Spinelli *et al.*, J. Mol. Biol. 3 de agosto de 2001; 311 (1): 123-9; Conrath *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. Octubre de 2001; 45 (10): 2807-12; Decanniere *et al.*, J. Mol. Biol. 26 de octubre de 2001; 313(3): 473-8; Nguyen *et al.*, Adv Immunol. 2001; 79: 261-96; Muruganandam *et al.*, FASEB J. Febrero de 2002; 16 (2): 240-2; Ewert *et al.*, Biochemistry 19 de marzo de 2002; 41 (11): 3628-36; Dumoulin *et al.*, Protein Sci. Marzo de 2002; 11 (3): 500-15; Cortez-Retamozo *et al.*, Int. J. Cancer. 20 de marzo de 2002; 98 (3): 456-62; Su *et al.*, Mol. Biol. Evol. Marzo de 2002; 19 (3): 205-15; van der Vaart JM., Methods Mol Biol. 2002; 178: 359-66; Vranken *et al.*, Biochemistry 9 de julio de 2002; 41 (27): 8570-9; Nguyen *et al.*, Immunogenetics abril de 2002; 54 (1): 39-47; Renisio *et al.*, Proteins 1 de junio de 2002; 47 (4): 546-55; Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 28 de junio de 2002; 277 (26): 23645-50; Ledebor *et al.*, J. Dairy Sci. junio de 2002; 85 (6): 1376-82; De Genst *et al.*, J. Biol. Chem. 16 de agosto de 2002; 277 (33): 29897-907; Ferrat *et al.*, Biochem. J. 1 de septiembre de 2002; 366 (Pt 2): 415-22; Thomassen *et al.*, Enzyme and Microbial Technol. 2002; 30: 273-8; Harmsen *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. Diciembre de 2002; 60 (4): 449-54; Jobling *et al.*, Nat Biotechnol. Enero de 2003; 21 (1): 77-80; Conrath *et al.*, Dev. Comp. Immunol. Febrero de 2003; 27 (2): 87-103; Pleschberger *et al.*, Bioconj. Chem. Marzo-abril de 2003; 14 (2): 440-8; Lah *et al.*, J. Biol. Chem. 18 de abril de 2003; 278 (16): 14101-11; Nguyen *et al.*, Immunology. Mayo de 2003; 109 (1): 93-101; Joosten *et al.*, Microb. Cell Fact. 30 de enero de 2003; 2 (1): 1; Li *et al.*, Proteins 1 de julio de 2003; 52 (1): 47-50; Loris *et al.*, Biol Chem. 25 de julio de 2003; 278 (30): 28252-7; van Koningsbruggen *et al.*, J. Immunol. Methods. Agosto de 2003; 279 (1-2): 149-61; Dumoulin *et al.*, Nature. 14 de agosto de 2003; 424 (6950): 783-8; Bond *et al.*, J. Mol. Biol. 19 de septiembre de 2003; 332 (3): 643-55; Yau *et al.*, J. Immunol. Methods. 1 de octubre de 2003; 281 (1-2): 161-75; Dekker *et al.*, J. Virol. Noviembre de 2003; 77 (22): 12132-9; Meddeb-Mouelhi *et al.*, Toxicon. Diciembre de 2003; 42 (7): 785-91; Verheesen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 5 de diciembre de 2003; 1624 (1-3): 21-8; Zhang *et al.*, J Mol Biol. 2 de enero de 2004; 335 (1): 49-56; Stijlemans *et al.*, J Biol Chem. 9 de enero de 2004; 279 (2): 1256-61; Cortez-Retamozo *et al.*, Cancer Res. 15 de abril de 2004; 64 (8): 2853-7; Spinelli *et al.*, FEBS Lett. 23 de abril de 2004; 564 (1-2): 35-40; Pleschberger *et al.*, Bioconj. Chem. Mayo-junio de 2004; 15 (3): 664-71; Nicaise *et*



*al.*, Protein Sci. Julio de 2004; 13 (7): 1882-91; Omidfar *et al.*, Tumour Biol. Julio-agosto de 2004; 25 (4): 179-87; Omidfar *et al.*, Tumour Biol. Septiembre-diciembre de 2004; 25(5-6): 296-305; Szytnol *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. Septiembre de 2004; 48(9):3390-5; Saerens *et al.*, J. Biol. Chem. 10 de diciembre de 2004; 279 (50): 51965-72; De Genst *et al.*, J. Biol. Chem. 17 de diciembre de 2004; 279 (51): 53593-601; Dolk *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. Enero de 2005; 71(1): 442-50; Joosten *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol. Enero de 2005; 66(4): 384-92; Dumoulin *et al.*, J. Mol. Biol. 25 de febrero de 2005; 346 (3): 773-88; Yau *et al.*, J Immunol Methods. Febrero de 2005; 297 (1-2): 213-24; De Genst *et al.*, J. Biol. Chem. 9 de abril de 2005; 280 (14): 14114-21; Huang *et al.*, Eur. J. Hum. Genet. 13 de abril de 2005; Dolk *et al.*, Proteins. 15 de mayo de 2005; 59 (3): 555-64; Bond *et al.*, J. Mol. Biol. 6 de mayo de 2005; 348(3):699-709; Zarebski *et al.*, J. Mol. Biol. 21 de abril de 2005; [publicación electrónica antes de la impresión].

Tal como se mencionó anteriormente, la invención se refiere generalmente a Nanobodies dirigidos contra vWF, así como a polipéptidos que comprenden o que consisten esencialmente en uno o más de tales Nanobodies, que pueden usarse para los propósitos profilácticos, terapéuticos y/o de diagnóstico descritos a continuación y en el documento WO 04/062551.

Tal como se mencionó también anteriormente y se describe adicionalmente a continuación, la invención se refiere además a ácidos nucleicos que codifican tales Nanobodies y polipéptidos, a métodos para preparar tales Nanobodies y polipéptidos, a células huésped que expresan o pueden expresar tales Nanobodies o polipéptidos, a usos de tales Nanobodies, polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped, y a composiciones que comprenden tales Nanobodies, polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped.

Generalmente, debe indicarse que el término Nanobody tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio no se limita a una fuente biológica específica o a un método de preparación específico. Por ejemplo, tal como se comentará en más detalle a continuación, los Nanobodies de la invención pueden obtenerse (1) aislando el dominio  $V_{HH}$  de un anticuerpo de cadena pesada que se produce de manera natural; (2) mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural; (3) mediante "humanización" (tal como se describe a continuación) de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio  $V_{HH}$  humanizado de este tipo; (4) mediante "camelización" (tal como se describe a continuación) de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de cualquier especie animal, en particular una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio  $V_H$  camelizado de este tipo; (5) mediante "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "Dab" tal como describen Ward *et al* (citado anteriormente), o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio  $V_H$  camelizado de este tipo; (6) usando técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos; (7) preparando un ácido nucleico que codifica un Nanobody usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos, seguido por la expresión del ácido nucleico así obtenido; y/o (8) mediante cualquier combinación de los anteriores. Métodos y técnicas adecuados para realizar lo anterior estarán claros para el experto basándose en la divulgación en el presente documento y por ejemplo incluyen los métodos y técnicas descritos en más detalle a continuación en el presente documento.

Sin embargo, según una realización específica, los Nanobodies de la invención no tienen una secuencia de aminoácidos que es exactamente la misma que (es decir, como un grado de identidad de secuencia del 100 % con) la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural, tal como la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de un mamífero, y en particular de un ser humano.

Una clase particularmente preferida de Nanobodies de la invención comprende Nanobodies con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural, pero que se ha "humanizado", es decir reemplazando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de  $V_{HH}$  que se produce de manera natural por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio  $V_H$  de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (por ejemplo indicado anteriormente). Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que quedará clara para el experto, por ejemplo basándose en la descripción adicional a continuación y la técnica anterior sobre la humanización a la que se hace referencia en el presente documento. De nuevo, debe indicarse que tales Nanobodies humanizados de la invención pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida *per se* (es decir tal como se indicó) anteriormente en los puntos (1) - (8) y por tanto no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural como material de partida.

Otra clase particularmente preferida de Nanobodies de la invención comprende Nanobodies con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural que se ha "camelizado", es decir reemplazando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio  $V_{HH}$  de un anticuerpo de cadena pesada. Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que quedará clara para el experto, por ejemplo basándose en la descripción adicional a continuación. Se hace también referencia al documento WO 94/04678. Tal camelización puede producirse preferentemente en posiciones de aminoácido que

están presentes en la superficie de contacto  $V_H$ - $V_L$  y en los denominados residuos distintivos de Camelidae (véase por ejemplo también el documento WO 94/04678), tal como se menciona también a continuación. Preferiblemente, el dominio o la secuencia de  $V_H$  que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el Nanobody camelizado es preferiblemente una secuencia de  $V_H$  de un mamífero, más preferiblemente la secuencia de  $V_H$  de un ser humano. Sin embargo, debe indicarse que tales Nanobodies camelizados de la invención pueden obtenerse de cualquier manera conocida *per se* (es decir tal como se indicó anteriormente en los puntos (1) - (8)) y por tanto no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural como material de partida.

Por ejemplo, de nuevo tal como se describe adicionalmente a continuación, tanto la “humanización” como la “camelización” pueden realizarse proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio  $V_{HH}$  o dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de este tipo, respectivamente, y luego cambiando, de una manera conocida *per se*, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifica un Nanobody humanizado o camelizado de la invención, respectivamente, y luego expresando la secuencia de nucleótidos así obtenida de una manera conocida *per se* para proporcionar el Nanobody deseado de la invención. Alternativamente, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  o dominio  $V_H$  que se produce de manera natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos del Nanobody humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, puede diseñarse y luego sintetizarse *de novo* usando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas *per se*. Además, basándose en la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un dominio  $V_{HH}$  o dominio  $V_H$  que se produce de manera natural, respectivamente, puede diseñarse una secuencia de nucleótidos que codifica el Nanobody humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, y luego sintetizarse *de novo* usando técnicas para la síntesis de ácido nucleico conocidas *per se*, tras lo cual la secuencia de nucleótidos así obtenida puede expresarse de una manera conocida *per se* para proporcionar el Nanobody deseado de la invención.

Otros modos y técnicas adecuados para obtener Nanobodies de la invención y/o secuencias de nucleótidos y/o ácidos nucleicos que codifican los mismos, partiendo de (la secuencia de aminoácidos de) dominios  $V_H$  o preferiblemente dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural y/o de secuencias de nucleótidos y/o secuencias de ácidos nucleicos que codifican los mismos estarán claros para el experto, y pueden comprender por ejemplo combinar una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos de dominios  $V_H$  que se producen de manera natural (tal como una o más FR y/o CDR) con una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos de dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural (tal como una o más FR o CDR), de una manera adecuada para proporcionar (una secuencia de nucleótidos o ácidos nucleicos que codifica) un Nanobody de la invención.

Según un aspecto preferido, pero no limitativo del aspecto de la invención, un Nanobody en su sentido más amplio puede definirse generalmente como un polipéptido que comprende:

a) una secuencia de aminoácidos que está compuesta por cuatro secuencias/regiones de entramado interrumpidas por tres secuencias/regiones determinantes de complementariedad, en la que el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

y/o:

b) una secuencia de aminoácidos que está compuesta por cuatro secuencias/regiones de entramado interrumpidas por tres secuencias/regiones determinantes de complementariedad, en la que el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat es E y en la que el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es una R;

y/o:

c) una secuencia de aminoácidos que está compuesta por cuatro secuencias/regiones de entramado interrumpidas por tres secuencias/regiones determinantes de complementariedad, en la que el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S, y se elige en particular del grupo que consiste en R y S.

Por tanto, en un primer aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la descripción puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que

i) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

y/o en la que:

ii) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat es E y en la que el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es una R;

y/o en la que:

iii) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S, y se elige en particular del grupo que consiste en R y S;

y en la que:

iv) CDR 1 es una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

NYGMG [SEQ ID NO: 15]

SYTLG [SEQ ID NO: 16]

NYNMG [SEQ ID NO: 17]

SSAMA [SEQ ID NO: 18]

YYNTG [SEQ ID NO: 19]

IGAMG [SEQ ID NO: 20]

IGTMG [SEQ ID NO: 21]

YNPMG [SEQ ID NO: 22]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en las que:

v) CDR 2 es una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

SISWSGTYTAYSDNVKG [SEQ ID NO: 23]

GISWSGVSTDYAEFAKG [SEQ ID NO: 24]

TSISWSGSYTAYADNVKG [SEQ ID NO: 25]

SISWSGMSTYYTDSVKG [SEQ ID NO: 26]

TITSGGRTSYADSVKG [SEQ ID NO: 27]

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                 |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|    | AISWSGGLTTYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 28] |
|    | TITSGGSTNYADPVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [SEQ ID NO: 29] |
| 5  | TITSGGSTNYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [SEQ ID NO: 30] |
|    | AISRTGGSTYYARSVEG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 31] |
| 10 | AISRTGGSTYYPDSVEG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 32] |
| 15 | o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en las que |                 |
| 20 | (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o                                                                                                                                                                                        |                 |
|    | (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);                                                                                                                                |                 |
|    | y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:                                                                                                                   |                 |
| 25 | (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o                                                                                                                                                                                        |                 |
| 30 | (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);                                                                                                                                |                 |
|    | y en las que:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                 |
| 35 | vi) CDR 3 es una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:                                                                                                                                                                                                                      |                 |
|    | QSRYSNYYDHDDKYAY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [SEQ ID NO: 33] |
|    | LGRYSNWRNIGQYDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | [SEQ ID NO: 34] |
| 40 | QSRYSNYYDHDDKYAY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [SEQ ID NO: 35] |
|    | SNRYRTHTTQAMYN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | [SEQ ID NO: 36] |
| 45 | VVDGKRAP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | [SEQ ID NO: 37] |
|    | NRRQKTVMGERAYDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | [SEQ ID NO: 38] |
|    | NLKQGSYGYRFNDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | [SEQ ID NO: 39] |
| 50 | NLKQGDYGYRFNDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | [SEQ ID NO: 40] |
|    | AGVRAEDGRVRTLPSEYNF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | [SEQ ID NO: 41] |
| 55 | AGVRAEDGRVRTLPSEYTF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | [SEQ ID NO: 42] |
|    | AGVRAEDGRVRLPSEYTF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | [SEQ ID NO: 43] |
| 60 | o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en la que     |                 |
| 65 | (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o                                                                                                                                                                                        |                 |
|    | (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);                                                                                                                                |                 |

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

5 (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

10

Preferiblemente, en los Nanobodies de la descripción:

- cuando CDR1 se elige del grupo que consiste en (1) YNPMG; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos; entonces CDR2 se elige del grupo que consiste en (1) AISRTGGSTYYARSVEG; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos; y CDR3 se elige del grupo que consiste en (1) AGVRAEDGRVRTLPSEYNF; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos;

20

- cuando CDR1 se elige del grupo que consiste en (1) YNPMG; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos; entonces CDR2 se elige del grupo que consiste en (1) AISRTGGSTYYPDSVEG; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos; y CDR3 se elige del grupo que consiste en (1) AGVRAEDGRVRTLPSEYTF; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos;

25

- cuando CDR1 se elige del grupo que consiste en (1) YNPMG; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos; entonces CDR2 se elige del grupo que consiste en (1) AISRTGGSTYYPDSVEG; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos; y CDR3 se elige del grupo que consiste en (1) AGVRAEDGRVRSPLPSEYTF; y (2) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con dicha secuencia de aminoácidos; en las que

30

35

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

40 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

En particular, un Nanobody contra vWF según la invención puede tener la estructura:

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que

50 i) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

y/o en la que:

55 ii) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat es E y en la que el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es una R;

y/o en la que:

60 iii) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S, y se elige en particular del grupo que consiste en R y S;

y en la que:

65 iv) CDR 1 es una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

YNPMG

[SEQ ID NO: 22]

y en la que:

- 5 v) CDR 2 es una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

AISRTGGSTYYARSVEG

[SEQ ID NO: 31]

10 AISRTGGSTYYPDSVEG

[SEQ ID NO: 32]

y en la que:

- 15 vi) CDR 3 es una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

AGVRAEDGRVRTLPSEYNF

[SEQ ID NO: 41]

AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

[SEQ ID NO: 42]

20 AGVRAEDGRVRSPLPSEYTF

[SEQ ID NO: 43]

Preferiblemente, en los Nanobodies de la invención según este último aspecto:

- 25 - Cuando CDR1 es: YNPMG; entonces CDR2 es: AISRTGGSTYYARSVEG; y CDR3 es: AGVRAEDGRVRTLPSEYNF

- Cuando CDR1 es: YNPMG; CDR2: AISRTGGSTYYPDSVEG; y CDR3 es: AGVRAEDGRVRTLPSEYTF

- 30 - Cuando CDR1 es: YNPMG; entonces CDR2 es: AISRTGGSTYYPDSVEG; y CDR3 es: AGVRAEDGRVRSPLPSEYTF

35 En particular, según un aspecto preferido, pero no limitativo del aspecto de la invención, un Nanobody puede definirse generalmente como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que está compuesta por cuatro secuencias/regiones de entramado interrumpidas por tres secuencias/regiones determinantes de complementariedad, en el que;

40 a-1) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en G, E, D, G, Q, R, S, L; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en G, E o Q; y

a-2) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en L, R o C; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en L o R; y

45 a-3) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en W, R o S; y es preferiblemente W o R, y es lo más preferiblemente W;

a-4) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

o en el que:

50 b-1) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en E y Q; y

b-2) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es R; y

55 b-3) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en W, R y S; y es preferiblemente W;

60 b-4) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en Q y L; y es preferiblemente Q;

o en el que:

65 c-1) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en G, E, D, Q, R, S y L; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en G, E y Q; y

- c-2) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en L, R y C; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en L y R; y
- 5 c-3) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S; y se elige en particular del grupo que consiste en R y S; y
- c-4) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en Q y L; es preferiblemente Q.
- 10 Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura
- FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4
- 15 en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:
- i) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en G, E, D, G, Q, R, S, L; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en G, E o Q;
- 20 y en la que:
- ii) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en L, R o C; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en L o R;
- 25 y en la que:
- iii) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en W, R o S; y es preferiblemente W o R, y es lo más preferiblemente W;
- 30 y en la que
- iv) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;
- 35 y en la que:
- v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.
- 40 En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura
- FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4
- 45 en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:
- i) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en E y Q;
- 50 y en la que:
- ii) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es R;
- 55 y en la que:
- iii) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en W, R y S; y es preferiblemente W;
- 60 y en la que:
- iv) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;
- 65 y en la que:
- vi) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las

definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

10 i) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en G, E, D, Q, R, S y L; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en G, E y Q;

y en la que:

15 ii) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en L, R y C; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en L y R;

y en la que:

20 iii) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S; y se elige en particular del grupo que consiste en R y S;

y en la que:

25 iv) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en Q y L; es preferiblemente Q;

y en la que:

30 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

35 Dos grupos particularmente preferidos, pero no limitativos de los Nanobodies de la invención son aquellos según a) anteriormente; según a-1) a a-4) anteriormente; según b) anteriormente; según b-1) a b-4) anteriormente; según c) anteriormente; y/o según c-1) a c-4) anteriormente, en los que;

40 a) los residuos de aminoácido en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW (o una secuencia similar a GLEW tal como se define en el presente documento) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

o en los que:

45 b) los residuos de aminoácido en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat forman la secuencia KERE o KQRE (o una secuencia similar a KERE) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q o L, y es preferiblemente Q.

Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

55 i) los residuos de aminoácido en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW (o una secuencia similar a GLEW tal como se define en el presente documento) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

y en la que:

60 ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

65 En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura



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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

i) los residuos de aminoácido en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat forman la secuencia KERE o KQRE (o una secuencia similar a KERE) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q o L, y es preferiblemente Q;

y en la que:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En los Nanobodies de la invención en los que los residuos de aminoácido en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat forman la secuencia KERE o KQRE, el residuo de aminoácido en la posición 37 es lo más preferiblemente F. En los Nanobodies de la invención en los que los residuos de aminoácido en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW, el residuo de aminoácido en la posición 37 se elige del grupo que consiste en Y, H, I, V o F, y es lo más preferiblemente F.

Por tanto, sin limitarse a lo mismo de ningún modo, basándose en los residuos de aminoácido presenten en las posiciones mencionadas anteriormente, los Nanobodies de la invención pueden clasificarse generalmente basándose en los siguientes tres grupos:

a) El "*grupo GLEW*": Nanobodies con la secuencia de aminoácidos GLEW en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat y Q en la posición 108 según la numeración de Kabat. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, los Nanobodies dentro de este grupo tienen habitualmente una V en la posición 37, y pueden tener un W, P, R o S en la posición 103, y tienen preferiblemente un W en la posición 103. El grupo GLEW también comprende algunas secuencias similares a GLEW tales como las mencionadas en la tabla 2 más adelante;

b) El "*grupo KERE*": Nanobodies con la secuencia de aminoácidos KERE o KQRE o en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat y Q o L en la posición 108 según la numeración de Kabat. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, los Nanobodies dentro de este grupo tienen habitualmente una F en la posición 37, una L o F en la posición 47; y pueden tener un W, P, R o S en la posición 103, y preferiblemente tienen un W en la posición 103;

c) El "*grupo 103 P, R, S*": Nanobodies con una P R o S en la posición 103. Estos Nanobodies pueden tener o bien la secuencia de aminoácidos GLEW en las posiciones 44-47 de la numeración de Kabat o bien la secuencia de aminoácidos KERE o KQRE en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat, esta última lo más preferiblemente en combinación con una F en la posición 37 y una L o una F en la posición 47 (tal como se define para el grupo KERE); y pueden tener Q o L en la posición 108 según la numeración de Kabat, y preferiblemente tienen Q.

Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede ser un Nanobody que pertenece al grupo GLEW (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede ser un Nanobody que pertenece al grupo KERE (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede ser un Nanobody que pertenece al grupo 103 P, R, S (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

Además, más generalmente y además de los residuos 108Q, 43E/44R y 103P,R,S mencionados anteriormente, los Nanobodies de la invención pueden contener, en una o más posiciones que, en un dominio  $V_H$  convencional, formarían (parte de) la superficie de contacto  $V_H/V_L$ , uno o más residuos de aminoácido que están más altamente cargados que los residuos de aminoácido que se producen de manera natural en la(s) misma(s) posición/posiciones en el dominio  $V_H$  o  $V_{HH}$  que se produce de manera natural correspondiente, y en particular uno o más residuos de

aminoácido cargados (tal como se menciona en la tabla 1).

Tales sustituciones incluyen, pero no se limitan a las secuencias similares a GLEW mencionadas en la tabla 2 más adelante; así como las sustituciones que se describen en la solicitud internacional WO 00/29004 para los denominados “microcuerpos”, por ejemplo una Q en la posición 108 y KLEW en las posiciones 44-47.

En los Nanobodies de la invención, el residuo de aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste en L, M, S, V y W; y es preferiblemente L.

Además, en los Nanobodies de la invención, el residuo de aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste en R, K, N, E, I y Q; y es lo más preferiblemente o bien K o bien E (para Nanobodies correspondientes a dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural) o R (para Nanobodies “humanizados”, tal como se describe a continuación). El residuo de aminoácido en la posición 84 se elige del grupo que consiste en P, A, R, S, D y V, y es lo más preferiblemente P (para Nanobodies correspondientes a dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural) o R (para Nanobodies “humanizados”, tal como se describe a continuación).

Además, en los Nanobodies de la invención, el residuo de aminoácido en la posición 104 se elige del grupo que consiste en G y D; y es lo más preferiblemente G.

Conjuntamente, los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108, que en los Nanobodies son tal como se mencionó anteriormente, se les denominará también en el presente documento “residuos distintivos”. Los residuos distintivos y los residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes del dominio VH humano más estrechamente relacionado,  $V_{H3}$ , se resumen en la tabla 2.

Algunas combinaciones especialmente preferidas de estos residuos distintivos tal como aparecen en dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural se mencionan en la tabla 3. Para comparación, los residuos de aminoácido correspondientes del  $V_{H3}$  humano denominado DP-47 se han indicado en cursiva.

Tabla 2: Residuos distintivos en Nanobodies

| Posición          | $V_{H3}$ humano               | Residuos distintivos                                                                                                           |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11                | L, V; predominantemente L     | L, M, S, V, W; preferiblemente L                                                                                               |
| 37                | V, I, F; habitualmente V      | $F^{(1)}$ , Y, H, I o V, preferiblemente $F^{(1)}$ o Y                                                                         |
| 44 <sup>(8)</sup> | G                             | $G^{(2)}$ , $E^{(3)}$ , D, Q, R, S, L; preferiblemente $G^{(2)}$ , $E^{(3)}$ o Q; lo más preferiblemente $G^{(2)}$ o $E^{(3)}$ |
| 45 <sup>(8)</sup> | L                             | $L^{(2)}$ , $R^{(3)}$ , C, I, L, P, Q, V; preferiblemente $L^{(2)}$ o $R^{(3)}$                                                |
| 47 <sup>(8)</sup> | W, Y                          | $W^{(2)}$ , $L^{(1)}$ o $F^{(1)}$ , A, G, I, M, R, S o Y; preferiblemente $W^{(2)}$ , $L^{(1)}$ , $F^{(1)}$ o R                |
| 83                | R o K; habitualmente R        | R, $K^{(5)}$ , N, $E^{(5)}$ , I, M o Q; preferiblemente K o R; lo más preferiblemente K                                        |
| 84                | A, T, D; predominantemente A  | $P^{(5)}$ , A, L, R, S, D, V; preferiblemente P                                                                                |
| 103               | W                             | $W^{(4)}$ , $P^{(6)}$ , $R^{(6)}$ , S; preferiblemente W                                                                       |
| 104               | G                             | G o D; preferiblemente G                                                                                                       |
| 108               | L, M o T; predominantemente L | Q, $L^{(7)}$ o R; preferiblemente Q o $L^{(7)}$                                                                                |

#### Notas:

(1): En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

(2): Habitualmente como GLEW en las posiciones 44-47.

(3): Habitualmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, por ejemplo como KEREL, KEREK, KQREL, KQREF o KEREK en las posiciones 43-47. Alternativamente, también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo TEREL), KECE (por ejemplo KECEL o KECER), RERE (por ejemplo REREG), QERE (por ejemplo QEREG), KGRE (por ejemplo KGREG), KDRE (por ejemplo KDREV). Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas incluyen por ejemplo DECKL y NVCEL.

(4): Con tanto GLEW en las posiciones 44-47 como KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

(5): A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural.

(6): En particular, pero no exclusivamente, en combinación con GLEW en las posiciones 44-47.

(7): Con la condición de que cuando las posiciones 44-47 son GLEW, la posición 108 es siempre Q.

5

(8): El grupo GLEW también contiene secuencias similares a GLEW en las posiciones 44-47, tal como por ejemplo GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER y ELEW.

Tabla 3: Algunas combinaciones preferidas de residuos distintivos en Nanobodies que se producen de manera natural.  
Para la humanización de estas combinaciones, se hace referencia a la memoria descriptiva.

|                       | 11       | 37       | 44       | 45       | 47       | 83       | 84       | 103      | 104      | 108      |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>DP-47 (humano)</i> | <i>M</i> | <i>V</i> | <i>G</i> | <i>L</i> | <i>W</i> | <i>R</i> | <i>A</i> | <i>W</i> | <i>G</i> | <i>L</i> |
|                       |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Grupo "KERE"          | L        | F        | E        | R        | L        | K        | P        | W        | G        | Q        |
|                       | L        | F        | E        | R        | F        | E        | P        | W        | G        | Q        |
|                       | L        | F        | E        | R        | F        | K        | P        | W        | G        | Q        |
|                       | L        | Y        | Q        | R        | L        | K        | P        | W        | G        | Q        |
|                       | L        | F        | L        | R        | V        | K        | P        | Q        | G        | Q        |
|                       | L        | F        | Q        | R        | L        | K        | P        | W        | G        | Q        |
|                       | L        | F        | E        | R        | F        | K        | P        | W        | G        | Q        |
|                       |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Grupo "GLEW"          | L        | V        | G        | L        | W        | K        | S        | W        | G        | Q        |
|                       | M        | V        | G        | L        | W        | K        | P        | R        | G        | Q        |

En los Nanobodies, cada residuo de aminoácido en cualquier otra posición distinta de los residuos distintivos puede ser cualquier residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la posición correspondiente (según la numeración de Kabat) de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural.

Tales residuos de aminoácido quedarán claros para el experto. Las tablas 4 - 7 mencionan algunos residuos no limitativos que pueden estar presentes en cada posición (según la numeración de Kabat) de las FR1, FR2, FR3 y FR4 de dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural. Para cada posición, el residuo de aminoácido que aparece lo más frecuentemente en cada posición de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural (y que es el residuo de aminoácido más preferido para dicha posición en un Nanobody) se indica en negrita; y otros residuos de aminoácido preferidos para cada posición se han subrayado (nota: el número de residuos de aminoácido que se encuentran en las posiciones 26-30 de dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural apoya la hipótesis subyacente a la numeración de Chothia (citada anteriormente) de que los residuos en estas posiciones forman ya parte de CDR1.)

En las tablas 4 - 7, algunos de los residuos no limitativos que pueden estar presentes en cada posición de un dominio  $V_{H3}$  humano se han mencionado también. De nuevo, para cada posición, el residuo de aminoácido que aparece lo más frecuentemente en cada posición de un dominio  $V_{H3}$  humano que se produce de manera natural se indica en negrita; y otros residuos de aminoácido preferidos se han subrayado.

Tabla 4: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR1 (para las notas al pie, véanse las notas al pie para la tabla 2)

| Pos. | Residuo(s) de aminoácido:                                                  |                                                    |
|------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|      | <i><math>V_{H3}</math> humano</i>                                          | <i><math>V_{HH}</math> de camélido</i>             |
| 1    | <b>E</b> , <u>Q</u>                                                        | <b>Q</b> , A, E, D, H, R                           |
| 2    | <b>V</b>                                                                   | <b>V</b> , A, E, G, L, M, Q                        |
| 3    | <b>Q</b>                                                                   | <b>Q</b> , K, E, H, P, R, Y                        |
| 4    | <b>L</b>                                                                   | <b>L</b> , F, P, R, V                              |
| 5    | <b>V</b> , L                                                               | <b>Q</b> , E, L, V, M, P, A, I                     |
| 6    | <b>E</b>                                                                   | <b>E</b> , D, Q, A, H                              |
| 7    | <b>S</b> , T                                                               | <b>S</b> , F, H                                    |
| 8    | <b>G</b> , R                                                               | <b>G</b> , A, R                                    |
| 9    | <b>G</b>                                                                   | <b>G</b> , E                                       |
| 10   | <b>G</b> , V                                                               | <b>G</b> , D, R, A, E, N, T, V                     |
| 11   | <b>Residuo distintivo:</b> L, M, S, V, W, F, N, P, T, Y; preferiblemente L |                                                    |
| 12   | <b>V</b> , I                                                               | <b>V</b> , A, G, M                                 |
| 13   | <b>Q</b> , K, R                                                            | <b>Q</b> , E, K, D, G, A, H, L, N, P, R, T         |
| 14   | <b>P</b>                                                                   | <b>A</b> , <u>Q</u> , A, G, P, T, V, E, F, I, N, S |
| 15   | <b>G</b>                                                                   | <b>G</b>                                           |
| 16   | <b>G</b> , <u>R</u>                                                        | <b>G</b> , A, E, D, N, P, R, S, V, W               |
| 17   | <b>S</b>                                                                   | <b>S</b> , <u>E</u> , T, N, P, A, C                |
| 18   | <b>L</b>                                                                   | <b>L</b> , V, M, Q, R                              |
| 19   | <b>R</b> , K                                                               | <b>R</b> , K, L, N, S, T, A, F, G, I, M, Q         |
| 20   | <b>L</b>                                                                   | <b>L</b> , <u>E</u> , I, V, M, S                   |
| 21   | <b>S</b>                                                                   | <b>S</b> , F, T, G, H, P, A                        |
| 22   | <b>C</b>                                                                   | <b>C</b>                                           |
| 23   | <b>A</b> , T                                                               | <b>A</b> , D, P, S, T, V, E, G, I, L, Q, R         |
| 24   | <b>A</b>                                                                   | <b>A</b> , I, S, T, V, C, E, F, G, L, N, P, Q, Y   |

|    |                |                                                      |
|----|----------------|------------------------------------------------------|
| 25 | <b>S</b>       | <b>S</b> , A, F, P, T, L, V                          |
| 26 | <b>G</b>       | <b>G</b> , D, E, R, S, V, A, I, M, P, T              |
| 27 | <b>F</b>       | S, F, R, L, P, G, N, A, D, E, H, I, K, M, Q, T, V, Y |
| 28 | <b>T</b>       | N, T, E, D, S, I, R, A, G, R, F, Y, L, M, P, V       |
| 29 | <b>F, V</b>    | F, L, D, S, I, G, V, A, E, P, T, Y                   |
| 30 | <b>S, D, G</b> | N, S, E, G, A, D, M, T, H, I, P, R, V, W             |

Tabla 5: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR2 (para las notas al pie, véanse las notas al pie para la tabla 2)

| Pos. | Residuo de aminoácido(s):                                                                                                                                                                                                        |                                                              |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|      | <i>V<sub>H3</sub> humano</i>                                                                                                                                                                                                     | <i>V<sub>HH</sub> de camélido</i>                            |
| 36   | <b>W</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>W</b>                                                     |
| 37   | <b>Residuo distintivo:</b> F <sup>(1)</sup> , Y, H, I, A, L, P, S o V preferiblemente F <sup>(1)</sup> o Y                                                                                                                       |                                                              |
| 38   | <b>R</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>R</b>                                                     |
| 39   | <b>Q</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>Q</b> , H, P, R, A, D, G, L, E                            |
| 40   | <b>A</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>A</b> , F, G, P, T, V, I, L, N, R, S, Y                   |
| 41   | <b>P, S, T</b>                                                                                                                                                                                                                   | <b>P</b> , A, L, S, I, Q, T                                  |
| 42   | <b>G</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>G</b> , E, D, R, T, V                                     |
| 43   | <b>K</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>K</b> , D, E, N, Q, R, T, V, A, L, M, S                   |
| 44   | <b>Residuo distintivo:</b> G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> , D, Q, R, S, L, A, F, K, M, N, P, V, W, Y; preferiblemente G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> o Q; lo más preferiblemente G <sup>(2)</sup> o E <sup>(3)</sup> . |                                                              |
| 45   | <b>Residuo distintivo:</b> L <sup>(2)</sup> , R <sup>(3)</sup> , C, I, L, P, Q, V, D, E, G, H, K, T; preferiblemente L <sup>(2)</sup> o R <sup>(3)</sup>                                                                         |                                                              |
| 46   | <b>E, V</b>                                                                                                                                                                                                                      | <b>E</b> , D, K, Q, V, A, G, N                               |
| 47   | <b>Residuo distintivo:</b> W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> o F <sup>(1)</sup> , A, G, I, M, R, S, D, E, H, K, Q, T, V o Y; preferiblemente W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> , F <sup>(1)</sup> o R                        |                                                              |
| 48   | <b>V</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>V</b> , I, L, A, C, E, F, G, H, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y |
| 49   | <b>S, A, G</b>                                                                                                                                                                                                                   | <b>A, S, A, G, T, V, D, E, I, L, Q, R, Y</b>                 |

5

Tabla 6: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR3 (para las notas al pie, véanse las notas al pie para la tabla 2)

| Pos. | Residuo de aminoácido(s):    |                                                        |
|------|------------------------------|--------------------------------------------------------|
|      | <i>V<sub>H3</sub> humano</i> | <i>V<sub>HH</sub> de camélido</i>                      |
| 66   | <b>R</b>                     | <b>R</b>                                               |
| 67   | <b>F</b>                     | <b>F</b> , L, V, A, D, I, S, Y                         |
| 68   | <b>T</b>                     | <b>T</b> , A, S, D, F, G, I, K, N                      |
| 69   | <b>I</b>                     | I, M, V, A, F, L, R, S, T                              |
| 70   | <b>S</b>                     | <b>S</b> , A, F, E, G, K, P, T, V                      |
| 71   | <b>R</b>                     | <b>R</b> , G, I, K, Q, S, T, W, A, F, L, M, N          |
| 72   | <b>D, E</b>                  | <b>D</b> , E, G, N, V, A, H, I, L, Q, S, T             |
| 73   | <b>N, D, G</b>               | <b>N</b> , D, F, I, K, S, T, Y, A, G, H, L, M, R, V    |
| 74   | <b>A, S</b>                  | <b>A</b> , D, G, N, P, S, T, F, H, I, L, R, V, Y       |
| 75   | <b>K</b>                     | <b>K</b> , A, E, K, L, N, Q, R, D, G, I, M, S, T, V, W |

|     |                                                                                                                                                       |                                                                |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 76  | N, S                                                                                                                                                  | N, D, K, R, S, T, Y, E, G, H, I, Q                             |
| 77  | S, I, I                                                                                                                                               | T, A, E, I, M, S, K, L, N, R, V                                |
| 78  | L, A                                                                                                                                                  | V, L, A, F, G, I, M, E, N, Q, R, S, T, W                       |
| 79  | Y, H                                                                                                                                                  | Y, A, D, F, H, S, T, C, E, I, L, N, V, W                       |
| 80  | L                                                                                                                                                     | L, F, V, M                                                     |
| 81  | Q                                                                                                                                                     | Q, E, R, T, G, H, I, K, L, M, N                                |
| 82  | M                                                                                                                                                     | M, I, L, V, G, P, T                                            |
| 82a | N, G                                                                                                                                                  | N, D, G, H, S, T, A, E, I, K, R, V                             |
| 82b | S                                                                                                                                                     | S, N, D, G, R, A, C, E, F, I, K, M, P, T, V                    |
| 82c | L                                                                                                                                                     | L, P, M, T, V                                                  |
| 83  | <b>Residuo distintivo:</b> R, K <sup>(5)</sup> , N, E <sup>(5)</sup> , I, M, A, D, G, L, Q, S, T o Q; preferiblemente K o R; lo más preferiblemente K |                                                                |
| 84  | <b>Residuo distintivo:</b> P <sup>(5)</sup> , A, L, R, S, D, V, F, G, H, N, T, Y; preferiblemente P                                                   |                                                                |
| 85  | E, G                                                                                                                                                  | E, D, G, Q, A, N, R, V, Y                                      |
| 86  | D                                                                                                                                                     | D, E, F, Y                                                     |
| 87  | T, M                                                                                                                                                  | T, S, A, C, M                                                  |
| 88  | A                                                                                                                                                     | A, G, S, D, L, N, P                                            |
| 89  | V, L                                                                                                                                                  | V, A, D, I, L, M, N, R, T, E, F, S                             |
| 90  | Y                                                                                                                                                     | Y, F, E, H, N                                                  |
| 91  | Y, H                                                                                                                                                  | Y, D, F, H, L, S, T, V, C, I, N, R, W                          |
| 92  | C                                                                                                                                                     | C                                                              |
| 93  | A, K, T                                                                                                                                               | A, N, G, H, K, R, S, T, V, Y, E, F, I, L, M, Q                 |
| 94  | K, R, T                                                                                                                                               | A, V, C, F, G, I, L, R, S, D, E, K, M, N, P, Q, T, W, Y T o K; |

Tabla 7: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR4 (para las notas al pie, véanse las notas al pie para la tabla 2)

| Pos. | Residuo de aminoácido(s):                                                                                                        |                                   |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|      | <i>V<sub>H3</sub> humano</i>                                                                                                     | <i>V<sub>HH</sub> de camélido</i> |
| 103  | <b>Residuo distintivo:</b> W <sup>(4)</sup> , P <sup>(6)</sup> , R <sup>(6)</sup> , S, F, G, K, L, N, Q, V, Y; preferiblemente W |                                   |
| 104  | <b>Residuo distintivo:</b> G, A, R, S, T o D; preferiblemente G                                                                  |                                   |
| 105  | Q, R                                                                                                                             | Q, E, K, P, R, G, H, L, S, V      |
| 106  | G                                                                                                                                | G                                 |
| 107  | T                                                                                                                                | T, A, I, N, P                     |
| 108  | <b>Residuo distintivo:</b> Q, L <sup>(7)</sup> , E, H, N, P, T o R; preferiblemente Q o L <sup>(7)</sup>                         |                                   |
| 109  | V                                                                                                                                | V                                 |
| 110  | T                                                                                                                                | T, I, A                           |
| 111  | V                                                                                                                                | V, A, I, G                        |
| 112  | S                                                                                                                                | S, F, A, L, P, T, Y               |
| 113  | S                                                                                                                                | S, A, L, P, F, T                  |

Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

i) los residuos distintivos son tal como se define en el presente documento;

y en la que:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

y en la que:

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[1] QVQLQESGGGXVQAGGSLRLSCAASG [26]

[SEQ ID NO: 1]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en la que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[36] WXRQAPGKXXEXVA [49]

[SEQ ID NO: 2]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal



como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en la que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNKNTVYLQMNSLXXEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 3]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en la que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[103] XXQGTXTVTSS [113] [SEQ ID NO: 4]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en la que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define

según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores;

5 en las que los residuos distintivos se indican mediante “X” y son tal como definió anteriormente en el presente documento y en las que los números entre corchetes se refieren a las posiciones de aminoácido según la numeración de Kabat.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

15 y en la que

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

20 [1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 5]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en las que

25 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

30 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indicó en la secuencia anterior;

35 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 “diferencia(s) de aminoácido” (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

40 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indicó en la secuencia anterior;

45 y en la que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos:

50 [36] WFRQAPGKERELVA [49] [SEQ ID NO: 6]

[36] WFRQAPGKEREFVA [49] [SEQ ID NO: 7]

55 [36] WFRQAPGKEREGA [49] [SEQ ID NO: 8]

[36] WFRQAPGKQRELVA [49] [SEQ ID NO: 9]

[36] WFRQAPGKQREFVA [49] [SEQ ID NO: 10]

60 [36] WYRQAPGKGLEWA [49] [SEQ ID NO: 11]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en las que

65

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

5 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

10 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

15 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

20 (3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

y en la que:

25 iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNKNTVILQMNSL**K**PEDTAVYYCAA [94]

[SEQ ID NO: 12]

30 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en las que

35 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

40 (3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

45 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

50 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

55 (3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

y en la que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos:

60 [103] **WG**QGT**Q**VTVSS [113]

[SEQ ID NO: 13]

[103] **WG**QGT**L**VTVSS [113]

[SEQ ID NO: 14]

65 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de

secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de la secuencia de aminoácidos anterior;  
en las que

5 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

10 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

15 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

20 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

25 (3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

y en la que:

30 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

40 y en la que

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

45 [1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 5]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

50 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

55 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indicó en la secuencia anterior;

y en la que:

60 ii) FR2 se elige del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos:

[36] WFRQAPGKERELVA [49] [SEQ ID NO: 6]

65 [36] WFRQAPGKEREFVA [49] [SEQ ID NO: 7]

[36] WFRQAPGKEREGA [49]

[SEQ ID NO: 8]

[36] WFRQAPGKQRELVA [49]

[SEQ ID NO: 9]

5 [36] WFRQAPGKQREFVA [49]

[SEQ ID NO: 10]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

10 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

15 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

20 y en la que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

25 [66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94]

[SEQ ID NO: 12]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

30 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

35 (3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

y en la que:

40 iv) FR4 se elige del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos:

[103] WGQGTQVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 13]

45 [103] WGQGTLVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 14]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en la que:

50 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 7; y/o

55 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

60 y en la que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

65 En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

y en la que

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 5]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indicó en la secuencia anterior;

y en la que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[36] WYRQAPGKGLEWA [49] [SEQ ID NO: 11]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

y en la que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 12]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

y en la que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[103] WGQGTQVTSS [113]

[SEQ ID NO: 13]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 7; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indicó en cada una de las secuencias anteriores;

y en la que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la invención puede tener la estructura

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

y en la que

i) FR1 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR1 presentes en los Nanobodies de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, y en particular en los Nanobodies humanizados de SEQ ID NO 86 a 97,

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR1; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR1; y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en dicha secuencia de FR1;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR1, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR1; y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en dicha secuencia de FR1;

y en la que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR2 presentes en los Nanobodies de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, y en particular en los Nanobodies humanizados de SEQ ID NO 86 a 97,

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR2; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR2; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indica en dicha secuencia de FR2;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR2, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR2; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indica en dicha secuencia de FR2;

y en la que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR3 presentes en los Nanobodies de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, y en particular en los Nanobodies humanizados de SEQ ID NO 86-97,

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR3; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR3; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indica en dicha secuencia de FR3;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR3, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR3; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indica en dicha secuencia de FR3;

y en la que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR4 presentes en los Nanobodies de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, y en particular en los Nanobodies humanizados de SEQ ID NO 86 a 97,

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR4; en las que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o



inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR4; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indica en dicha secuencia de FR3;

5 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR4, en las que:

10 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR4; y

15 (3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indica en dicha secuencia de FR4;

y en la que:

20 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

25 Algunos Nanobodies particularmente preferidos de la descripción pueden elegirse del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, y en particular en los Nanobodies humanizados de SEQ ID NO 86 a 97 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97 (y preferiblemente de SEQ ID NO 86 a 97); en las que

30 (1) los residuos distintivos pueden ser tal como se indicó en la tabla 2 anteriormente;

(2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en las tablas 4-7; y/o

35 (3) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

40 Algunos Nanobodies incluso más particularmente preferidos de la descripción pueden elegirse del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, y en particular en los Nanobodies humanizados de SEQ ID NO 86 a 97 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97 (y preferiblemente de SEQ ID NO 86 a 97); en las que

(1) los residuos distintivos son tal como se indica en la secuencia pertinente elegida de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97 (y preferiblemente de SEQ ID NO 86 a 97);

50 (2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición distinta de una posición distintiva es preferiblemente o bien una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o bien una sustitución de aminoácido tal como se define en las tablas 4-7; y/o

55 (3) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia pertinente elegida de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97 (y preferiblemente de SEQ ID NO 86 a 97).

60 Algunos de los Nanobodies más preferidos de la descripción pueden elegirse del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, y en particular de los Nanobodies humanizados de SEQ ID NO 86 a 97.

65 Tal como quedará claro a partir de lo anterior, el término Nanobodies de la descripción tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio también comprende mutantes, variantes, alelos, análogos y ortólogos mutantes o sintéticos (a continuación en el presente documento denominados conjuntamente "análogos") de los Nanobodies mencionados en la SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97.

Generalmente, tales análogos pueden comprender por ejemplo secuencias homólogas, porciones funcionales o una porción funcional de una secuencia homóloga (tal como se define adicionalmente más adelante) de un Nanobody. Generalmente, en tales análogos, cada residuo de aminoácido (distinto del residuo distintivo) en cada una de las regiones de entramado puede reemplazarse por cualquier otro residuo de aminoácido, siempre que el grado total de identidad de secuencia de las regiones de entramado siga siendo tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, sin embargo, en tales análogos:

- uno o residuos de aminoácido en las secuencias de región de entramado anteriores se reemplazan por uno o más residuos de aminoácido que se aparecen de manera natural en la misma posición en un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural. Algunos ejemplos de tales sustituciones se mencionan en las tablas 4-7 anteriores;

y/o:

- uno o residuos de aminoácido en las secuencias de región de entramado anteriores se reemplazan por uno o más residuos de aminoácido que pueden considerarse una sustitución de aminoácido "conservativa", tal como se describió anteriormente en el presente documento;

y/o:

- uno o residuos de aminoácido en las secuencias de región de entramado anteriores se reemplazan por uno o más residuos de aminoácido que aparecen de manera natural en la misma posición en un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de un ser humano. Esto se denomina generalmente "humanización" del  $V_{HH}$ /Nanobody que se produce de manera natural en general y de dicha posición en particular, y se comentará en más detalle más adelante en el presente documento;

y:

- posiciones para las que solo se menciona un residuo de aminoácido para tanto el dominio  $V_H$  como el dominio  $V_{HH}$  en las tablas 4 - 7 anteriores preferiblemente no se reemplazan.

Además, aunque generalmente menos preferidos, en tales análogos, uno o más residuos de aminoácido pueden delecionarse de las regiones de entramado y/o insertarse en las regiones de entramado (opcionalmente además de una o más sustituciones de aminoácidos tal como se mencionó anteriormente), siempre que el grado total de identidad de secuencia de las regiones de entramado siga siendo tal como se define en el presente documento. Los residuos distintivos no deben delecionarse. Además, lo más preferiblemente, residuos de aminoácido para los que solo se menciona un residuo de aminoácido para tanto el dominio  $V_H$  como el dominio  $V_{HH}$  en las tablas 4 - 7 anteriores preferiblemente no se delecionan.

Preferiblemente, tales análogos deben ser tales que todavía pueden unirse a, tener afinidad por y/o tener especificidad por vWF, es decir con una afinidad y/o una especificidad que es de al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 70 %, incluso más preferiblemente al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o más, de la afinidad y/o especificidad de al menos uno de los Nanobodies de SEQ ID NO 60 a 73 y SEQ ID NO 86 a 97, tal como se determina usando un ensayo adecuado, por ejemplo un ensayo para determinar la unión del análogo a vWF, y en particular uno de los ensayos usados en los ejemplos más adelante.

Generalmente, tales análogos pueden obtenerse por ejemplo proporcionando un ácido nucleico que codifica un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural, cambiando los codones para el uno o más residuos de aminoácido que van a humanizarse en los codones para el/los residuo(s) de aminoácido humano(s) correspondiente(s), expresando la secuencia de ácido nucleico/nucleótidos así obtenida en un huésped o sistema de expresión adecuado; y opcionalmente aislando y/o purificando el análogo así obtenido para proporcionar dicho análogo en forma esencialmente aislada (tal como se definió anteriormente en el presente documento). Esto puede realizarse generalmente usando métodos y técnicas conocidos *per se*, que quedarán claros para el experto, por ejemplo a partir de los manuales y las referencias citados en el presente documento y/o a partir de la descripción adicional a continuación en el presente documento. Alternativamente, y por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un análogo puede sintetizarse de una manera conocida *per se* (por ejemplo usando un aparato automatizado para sintetizar secuencias de ácido nucleico con una secuencia de aminoácidos predefinida) y puede expresarse en un huésped o sistema de expresión adecuado, tras lo cual el análogo así obtenido puede aislarse y/o purificarse opcionalmente para proporcionar dicho análogo en forma esencialmente aislada (tal como se definió anteriormente en el presente documento). Otro modo de proporcionar los análogos implica la síntesis química de la secuencia de aminoácidos pertinente usando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas *per se*, tales como las mencionadas más adelante en el presente documento.

También quedará generalmente claro para el experto que los Nanobodies (incluyendo análogos de los mismos) también pueden prepararse partiendo de secuencias de  $V_H$  humanas (es decir secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos correspondientes), tales como por ejemplo secuencias de  $V_{H3}$  humanas tales como DP-

47, DP-51 o DP-29, cambiando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicho dominio V<sub>H</sub> humano, para proporcionar una secuencia de aminoácidos que tiene (a) una Q en la posición 108; y/o (b) E en la posición 44 y/o R en la posición 45, y preferiblemente E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103, tal como se describió anteriormente. De nuevo, esto puede realizarse generalmente usando los diversos métodos y técnicas a los que se hizo referencia en el párrafo anterior, usando una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos para un dominio V<sub>H</sub> humano como punto de partida.

El término Nanobodies tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio también comprende partes o fragmentos de los Nanobodies (incluyendo análogos) de la invención tal como se define en el presente documento, que pueden ser de nuevo tal como se describe adicionalmente a continuación.

Generalmente, partes o fragmentos de los Nanobodies y/o análogos tienen secuencias de aminoácidos en las que, en comparación con la secuencia de aminoácidos del Nanobody o análogo de longitud completa correspondiente, uno o más de los residuos de aminoácido en el extremo N-terminal, uno o más residuos de aminoácido en el extremo C-terminal, uno o más residuos de aminoácido internos contiguos, o cualquier combinación de los mismos, se han delecionado y/o eliminado. También es posible combinar uno o más de tales partes o fragmentos para proporcionar un Nanobody de la invención.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de un Nanobody que comprende una o más partes o fragmentos de un Nanobody y/o análogo de longitud completa debe tener un grado de identidad de secuencia de al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 60 %, más preferiblemente al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %, con la secuencia de aminoácidos del Nanobody de longitud completa correspondiente.

Además, la secuencia de aminoácidos de un Nanobody que comprende una o más partes o fragmentos de Nanobody y/o análogo de longitud completa es preferiblemente tal que comprende al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, más preferiblemente al menos 30 residuos de aminoácido contiguos, tales como al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, de la secuencia de aminoácidos del Nanobody de longitud completa correspondiente.

Generalmente, tales partes o fragmentos de los Nanobodies de la invención tendrán secuencias de aminoácidos en las que, en comparación con la secuencia de aminoácidos del Nanobody de longitud completa correspondiente de la invención, uno o más de los residuos de aminoácido en el extremo N-terminal, uno o más residuos de aminoácido en el extremo C-terminal, uno o más residuos de aminoácido internos contiguos, o cualquier combinación de los mismos, se han delecionado y/o eliminado. También es posible combinar una o más de tales partes o fragmentos para proporcionar un Nanobody de la invención.

Según una realización preferida, un fragmento tal como se usa en el presente documento comprende al menos una de las CDR presentes en un Nanobody de tamaño completo de la invención, preferiblemente al menos dos de las CDR presentes en un Nanobody de tamaño completo de la invención, más preferiblemente al menos CDR2 y CDR3 presentes en un Nanobody de tamaño completo de la invención, tal como por ejemplo las tres CDR presentes en un Nanobody de tamaño completo de la invención.

Según otra realización particularmente preferida, pero no limitativa, una parte o fragmento de este tipo comprende al menos FR3, CDR3 y FR4 del Nanobody de longitud completa correspondiente de la invención, es decir tal como se describe por ejemplo en la solicitud internacional WO 03/050531 (Lasters *et al.*).

Preferiblemente, tales partes o fragmentos deben ser tales que todavía puedan unirse a, tener afinidad por y/o tener especificidad por vWF, es decir con una afinidad y/o una especificidad que es de al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 70 %, incluso más preferiblemente al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o más, de la afinidad y/o especificidad del Nanobody de tamaño completo correspondiente de la invención, por ejemplo un ensayo para determinar la unión del análogo a vWF, y en particular uno de los ensayos usados en los ejemplos más adelante.

A partir de la descripción anteriormente en el presente documento, quedará claro que las secuencias de aminoácidos de los Nanobodies usados en el presente documento difieren en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones de entramado con respecto a las secuencias de aminoácidos de dominios V<sub>H</sub> que se producen de manera natural, tales como las secuencias de aminoácidos de dominios V<sub>H</sub> que se producen de manera natural de anticuerpos de seres humanos. En particular, quedará claro que las secuencias de aminoácidos de los Nanobodies usados en el presente documento difieren en al menos uno de los residuos distintivos con respecto a las secuencias de aminoácidos de dominios V<sub>H</sub> que se producen de manera natural, tales como las secuencias de aminoácidos de dominios V<sub>H</sub> que se producen de manera natural de anticuerpos de camélidos y/o seres humanos.

Por tanto, según una realización específica, un Nanobody de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una posición de aminoácido en una de las regiones de entramado con respecto a la secuencia de aminoácidos de un dominio V<sub>H</sub> que se produce de manera natural. Según una realización más específica, pero no

limitativa de la invención, un Nanobody de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno de los residuos distintivos con respecto a la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural.

A partir de la descripción anteriormente en el presente documento, también quedará claro que las secuencias de aminoácidos de algunos de los Nanobodies de la invención, tales como los Nanobodies humanizados de la invención, diferirán en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones de entramado (es decir o bien en la posición de un residuo distintivo o bien en otra posición) con respecto a las secuencias de aminoácidos de dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural. Por tanto, según una realización específica, pero no limitativa, un Nanobody de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una posición de aminoácido en una de las regiones de entramado con respecto a la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural. Según una realización más específica, pero no limitativa de la invención, un Nanobody de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno de los residuos distintivos con respecto a la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural.

Tal como se mencionó anteriormente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que comprenden al menos un dominio  $V_{HH}$  (es decir tal como se identifica usando los métodos de la invención) o al menos un Nanobody basado en el mismo.

Según una realización no limitativa de la invención, un polipéptido de este tipo de la invención consiste esencialmente en un Nanobody. Por “consiste esencialmente en” quiere decirse que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención o bien es exactamente la misma que la secuencia de aminoácidos de un Nanobody (tal como se mencionó anteriormente) o bien corresponde a la secuencia de aminoácidos de un Nanobody en el que un número limitado de residuos de aminoácido, tal como 1-10 residuos de aminoácido y preferiblemente 1-6 residuos de aminoácido, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácido, se han añadido al extremo amino terminal, al extremo carboxilo terminal, o tanto al extremo amino terminal como al extremo carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos del Nanobody.

Dichos residuos de aminoácido pueden o no cambiar, alterar o influir de otra forma en las propiedades (biológicas) del Nanobody y pueden añadir o no una funcionalidad adicional al Nanobody. Por ejemplo, dichos residuos de aminoácido pueden:

a) formar una “etiqueta”, es decir una secuencia de aminoácidos o residuo que permite o facilita la purificación del Nanobody, por ejemplo usando técnicas de afinidad dirigidas contra dicha secuencia o residuo. Después de eso, dicha secuencia o residuo puede eliminarse (por ejemplo mediante escisión química o enzimática) para proporcionar la secuencia de nucleótidos de la invención (para este propósito, la secuencia o residuo puede estar unida opcionalmente a la secuencia de aminoácidos de la invención por medio de una secuencia de ligador escindible). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales residuos son múltiples residuos de histidina y residuos de glutatión,

b) pueden ser un residuo de Met N-terminal, por ejemplo como resultado de la expresión en una célula huésped u organismo huésped heterólogo.

c) pueden ser uno o más residuos de aminoácido que pueden estar dotados de grupos funcionales y/o que se han funcionalizado, de una manera conocida *per se*. Por ejemplo, tal como se conoce en la técnica, residuos de aminoácido tales como lisina y en particular cisteína permiten la unión de grupos de PEG, que pueden enmascarar un sitio de superficie sobre una proteína y por tanto disminuir por ejemplo la inmunogenicidad, mejorar la semivida en plasma y estabilizar frente a la escisión proteolítica;

d) aumentar la semivida en suero de un Nanobody o polipéptido de la invención. El experto conoce bien secuencias de aminoácidos que pueden unirse a y/o fusionarse con proteínas terapéuticas con el fin de aumentar su semivida *in vivo* e incluyen proteínas séricas humanas o fragmentos de las mismas (tales como albúmina sérica humana o una parte o fragmento de la misma), o incluso porciones Fc de anticuerpos (en particular de anticuerpos humanos). Además, tal como ya se ha descrito en el presente documento, una secuencia de aminoácidos de este tipo para aumentar la semivida puede ser una secuencia de aminoácidos dirigida contra una proteína sérica, tal como un Nanobody dirigido contra una proteína sérica, por ejemplo contra albúmina sérica humana.

Con respecto a la pegilación, debe indicarse que, generalmente, la invención también abarca cualquier Nanobody de la invención y/o polipéptido de la invención que se ha pegilado en una o más posiciones de aminoácido, preferiblemente de un modo tal que dicha pegilación o bien (1) aumenta la semivida *in vivo*; (2) reduce la inmunogenicidad; (3) proporciona una o más propiedades beneficiosas adicionales conocidas *per se* para la pegilación; (4) no afecta esencialmente a la afinidad del Nanobody y/o polipéptido por vWF (por ejemplo no reduce dicha afinidad en más del 90 %, preferiblemente no en más del 50 % y más preferiblemente no en más del 10 %, tal como se determina mediante un ensayo adecuado, tales como los descritos en los ejemplos más adelante); y/o (4) no afecta a ninguna de las otras propiedades deseadas de los Nanobodies y/o polipéptidos de la invención. Grupos de PEG adecuados y métodos para unirlos, o bien específicamente o bien no específicamente, quedarán claros para

el experto. Pueden obtenerse por ejemplo kits y reactivos adecuados para tal pegilación de Nektar (CA, EE. UU.).

Según una realización no limitativa, uno o más residuos de aminoácido pueden añadirse a, insertarse en y/o sustituirse en la secuencia de aminoácidos de un Nanobody o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácido específicos para la unión a un grupo de PEG.

La invención también abarca cualquier Nanobody de la invención y/o polipéptido de la invención que se ha glicosilado en una o más posiciones de aminoácido, habitualmente dependiendo del huésped usado para expresar el Nanobody o polipéptido de la invención (tal como se describe adicionalmente a continuación).

Según una realización no limitativa, uno o más residuos de aminoácido pueden añadirse a, insertarse en y/o sustituirse en la secuencia de aminoácidos de un Nanobody o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácido específicos y/o un sitio que puede glicosilarse por el organismo huésped usado. Por medio de un ejemplo preferido, pero no limitativo, el residuo de N en la posición 50 dentro de la CDR2 de un Nanobody de la invención puede reemplazarse por ejemplo por un residuo de Q, D o S para proporcionar un sitio de glicosilación, por ejemplo para la glicosilación por *Pichia*.

Según otra realización, un polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de un Nanobody, que está fusionada en su extremo amino terminal, en su extremo carboxilo terminal, o tanto en su extremo amino terminal como en su extremo carboxilo terminal con al menos una secuencia de aminoácidos adicional.

De nuevo, dicha(s) secuencia(s) de aminoácidos adicional(es) puede(n) o no cambiar, alterar o influir de otra forma en las propiedades (biológicas) del Nanobody y pueden o no añadir una funcionalidad adicional al Nanobody.

Por ejemplo, según una realización preferida, pero no limitativa, dicha secuencia de aminoácidos adicional puede comprender al menos un Nanobody adicional, para proporcionar un polipéptido de la invención que comprende al menos dos, tal como tres, cuatro o cinco, Nanobodies, en el que dichos Nanobodies pueden estar opcionalmente unidos por medio de una o más secuencias de ligador (tal como se define en el presente documento).

Polipéptidos de la invención que comprenden dos o más Nanobodies también se denominarán en el presente documento polipéptidos "multivalentes". Por ejemplo un polipéptido "bivalente" de la invención comprende dos Nanobodies, opcionalmente unidos por medio de una secuencia de ligador, mientras que un polipéptido "trivalente" de la invención comprende tres Nanobodies, opcionalmente unidos por medio de dos secuencias de ligador; etc.

En un polipéptido multivalente de la invención, los dos o más Nanobodies pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, los dos o más Nanobodies en un polipéptido multivalente de la invención:

- pueden estar dirigidos contra el mismo antígeno, es decir contra las mismas partes o epítomos de dicho antígeno o contra dos o más partes o epítomos diferentes de dicho antígeno; y/o:

- pueden estar dirigidos contra los diferentes antígenos;

o una combinación de los mismos.

Por tanto, un polipéptido bivalente de la invención por ejemplo:

- puede comprender dos Nanobodies idénticos;

- puede comprender un primer Nanobody dirigido contra una primera parte o epítomo de un antígeno y un segundo Nanobody dirigido contra la misma parte o epítomo de dicho antígeno o contra otra parte o epítomo de dicho antígeno;

- o puede comprender un primer Nanobody dirigido contra un primer antígeno y un segundo Nanobody dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno;

mientras que un polipéptido trivalente de la invención por ejemplo:

- puede comprender tres Nanobodies idénticos o diferentes dirigidos contra las mismas o diferentes partes o epítomos del mismo antígeno;

- puede comprender dos Nanobodies idénticos o diferentes dirigidos contra las mismas o diferentes partes o epítomos en un primer antígeno y un tercer Nanobody dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno; o

- puede comprender un primer Nanobody dirigido contra un primer antígeno, un segundo Nanobody dirigido contra

un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno y un tercer Nanobody dirigido contra un tercer antígeno diferente de dicho primer y segundo antígeno.

Polipéptidos de la invención que contienen al menos dos Nanobodies, en los que al menos un Nanobody está dirigido contra un primer antígeno y al menos un Nanobody está dirigido contra un segundo Nanobody diferente del primer antígeno, se denominarán también Nanobodies “multiespecíficos”. Por tanto, un Nanobody “biespecífico” es un Nanobody que comprende al menos un Nanobody dirigido contra un primer antígeno y al menos un Nanobody adicional dirigido contra un segundo antígeno, mientras que un Nanobody “triespecífico” es un Nanobody que comprende al menos un Nanobody dirigido contra un primer antígeno, al menos un Nanobody adicional dirigido contra un segundo antígeno, y al menos un Nanobody adicional dirigido contra un tercer antígeno; etc.

Por consiguiente, en su forma más sencilla, un polipéptido biespecífico de la invención es un polipéptido bivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende un primer Nanobody dirigido contra un primer antígeno y un segundo Nanobody dirigido contra un segundo antígeno, en el que dicho primer y segundo Nanobody pueden estar opcionalmente unidos por medio de una secuencia de ligador (tal como se define en el presente documento); mientras que un polipéptido triespecífico de la invención en su forma más sencilla es un polipéptido trivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende un primer Nanobody dirigido contra un primer antígeno, un segundo Nanobody dirigido contra un segundo antígeno y un tercer Nanobody dirigido contra un tercer antígeno, en el que dicho primer, segundo y tercer Nanobody pueden estar opcionalmente unidos por medio de uno o más, y en particular uno, y más en particular dos secuencias de ligador.

Sin embargo, tal como quedará claro a partir de la descripción anteriormente en el presente documento, la invención no se limita a la misma, en el sentido de que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender cualquier número de Nanobodies dirigidos contra dos o más antígenos diferentes.

Para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios  $V_{HH}$  y su preparación, se hace también referencia a Conrath *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 276, 10. 7346-7350, así como al documento EP 0 822 985.

Los ligadores para su uso en polipéptidos multivalentes y multiespecíficos quedarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen ligadores de gly-ser, por ejemplo del tipo  $(gly_xser_y)_z$ , tal como (por ejemplo  $(gly_4ser)_3$  o  $(gly_3ser_2)_3$ , tal como se describe en el documento WO 99/42077, regiones de tipo bisagra tales como las regiones bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural o secuencias similares. Para otros ligadores adecuados, también se hace referencia a los antecedentes generales de la técnica citados anteriormente. Algunos ligadores particularmente preferidos se facilitan en SEQ ID NO 83 a 85, en las que los ligadores de SEQ ID NO 84 y 85 se prefieren particularmente.

Los ligadores también pueden proporcionar alguna funcionalidad para el polipéptido multivalente o multiespecífico. Por ejemplo, ligadores que contienen uno o más residuos de aminoácido cargados (véase la tabla 1 anteriormente) pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que ligadores que forman o contienen etiquetas o epítopos pequeños pueden usarse para los propósitos de detección, identificación y/o purificación.

Tal como se describe también adicionalmente en el presente documento, un polipéptido multiespecífico de la invención dirigido contra un antígeno deseado y contra al menos una proteína sérica, tal como las proteínas séricas mencionadas a continuación en el presente documento, y en particular contra albúmina sérica humana, puede mostrar semivida aumentada en suero, en comparación con el Nanobody monovalente correspondiente.

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, los métodos descritos en el presente documento son particularmente adecuados para generar tales polipéptidos multivalentes o multiespecíficos de la invención.

En un polipéptido de la invención, el al menos un Nanobody puede estar unido también a un dominio  $V_H$  convencional o a un análogo natural o sintético de un dominio  $V_H$ , opcionalmente por medio de una secuencia de ligador.

En un polipéptido de la invención, el al menos un Nanobody puede estar unido también a un dominio  $V_L$  o a un análogo natural o sintético de un dominio  $V_L$ , opcionalmente por medio de una secuencia de ligador, para proporcionar un polipéptido de la invención que está en la forma análoga a un fragmento scFv convencional, pero que contiene un Nanobody en lugar de un dominio  $V_H$ .

En un polipéptido de la invención, el al menos un Nanobody puede estar unido también a uno o más de un dominio CH1, CH2 y/o CH3, opcionalmente por medio de una secuencia de ligador. Por ejemplo, un Nanobody unido a un dominio CH1 adecuado podría usarse por ejemplo, junto con cadenas ligeras adecuadas, para generar fragmentos de anticuerpo/estructuras análogas a fragmentos Fab o fragmentos  $F(ab')_2$  convencionales, pero en los que uno o (en el caso de un fragmento  $F(ab')_2$ ) uno o ambos de los dominios  $V_H$  convencionales se han reemplazado por un Nanobody. Tales fragmentos pueden ser también heteroespecíficos o biespecíficos, es decir dirigidos contra dos o más antígenos. Un Nanobody unido a dominios CH2 y CH3 adecuados, por ejemplo derivados de camélidos, podría usarse para formar un anticuerpo de cadena pesada monoespecífico o biespecífico. Finalmente, un Nanobody unido

a dominios CH1, CH2 y CH3 adecuados, por ejemplo derivados de un ser humano, podría usarse, junto con cadenas ligeras adecuadas, para formar un anticuerpo que es análogo a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, pero en el que uno o ambos de los dominios  $V_H$  convencionales se han reemplazado por un Nanobody.

5 Además, adicionalmente al uno o más Nanobodies, los polipéptidos de la invención pueden contener también grupos funcionales, restos o residuos, por ejemplo sustancias terapéuticamente activas, tales como las mencionadas más adelante, y/o marcadores o etiquetas, tales como marcadores fluorescentes, isótopos, etc., tal como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento.

10 Los Nanobodies de la invención, los polipéptidos de la invención y ácidos nucleicos que codifican los mismos, pueden prepararse de una manera conocida *per se*, tal como quedará claro para el experto a partir de la descripción adicional en el presente documento. Algunos métodos preferidos, pero no limitativos para preparar los Nanobodies, polipéptidos y ácidos nucleicos incluyen los métodos y las técnicas mencionados anteriormente y/o descritos adicionalmente a continuación en el presente documento.

15 Tal como quedará claro para el experto, un método particularmente útil para preparar un Nanobody y/o un polipéptido de la invención comprende generalmente las etapas de:

20 - la expresión, en una célula huésped u organismo huésped adecuado (también denominado en el presente documento "*huésped de la invención*") o en otro sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifica dicho Nanobody o polipéptido de la invención (también denominado en el presente documento "*ácido nucleico de la invención*"), opcionalmente seguido por:

25 - aislar y/o purificar el Nanobody o polipéptido de la invención así obtenido.

En particular, un método de este tipo puede comprender las etapas de:

30 - cultivar y/o mantener un huésped de la invención en condiciones que son tales que dicho huésped de la invención expresa y/o produce al menos un Nanobody y/o polipéptido de la invención; opcionalmente seguido por:

- aislar y/o purificar el Nanobody o polipéptido de la invención así obtenido.

35 Un ácido nucleico de la invención puede estar en forma de ADN o ARN mono o bicatenario, y está preferiblemente en forma de ADN bicatenario. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser ADN genómico, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codones que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula huésped u organismo huésped previsto).

40 Según una realización de la invención, el ácido nucleico de la invención está en forma esencialmente aislada, tal como se definió anteriormente en el presente documento.

El ácido nucleico de la invención puede estar también en forma de, estar presente en y/o ser parte de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido o YAC, que de nuevo puede estar en forma esencialmente aislada.

45 Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse u obtenerse de una manera conocida *per se*, basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención facilitada en el presente documento, y/o pueden aislarse a partir de una fuente natural adecuada. Para proporcionar análogos, las secuencias de nucleótidos que codifican dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural pueden someterse por ejemplo a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifica dicho análogo. Además, tal como quedará claro para el experto, para preparar un ácido nucleico de la invención, también 50 varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un Nanobody y por ejemplo ácidos nucleicos que codifican uno o más ligadores pueden unirse entre sí de una manera adecuada.

Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la invención quedarán claras para el experto y pueden incluir por ejemplo, pero sin limitarse a, síntesis de ADN automatizada; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más 55 secuencias sintéticas y/o que se producen de manera natural (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que conducen a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo para crear casetes y/o regiones que pueden digerirse y/o ligarse fácilmente usando enzimas de restricción adecuadas) y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción PCR usando uno o más cebadores "apareados erróneamente", usando por ejemplo una secuencia de un GPCR que se produce de manera 60 natural como molde. Estas y otras técnicas quedarán claras para el experto, y se hace de nuevo referencia a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente, así como a los ejemplos más adelante.

65 El ácido nucleico de la invención también puede estar en forma de, estar presente en y/o ser parte de un constructo genético, tal como quedará claro para el experto en la técnica. Tales constructos genéticos comprenden generalmente al menos un ácido nucleico de la invención que está opcionalmente unido a uno o más elementos de

constructos genéticos conocidos *per se*, tales como por ejemplo uno o más elementos reguladores apropiados (tales como un(os) promotor(es), potenciador(es), terminador(es) adecuado(s), etc.) y los elementos adicionales de constructos genéticos a los que se hace referencia a continuación en el presente documento. Tales constructos genéticos que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención de denominarán también en el presente documento “*constructos genéticos de la invención*”.

Los constructos genéticos de la invención pueden ser ADN o ARN, y son preferiblemente ADN bicatenario. Los constructos genéticos de la invención pueden estar también en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped u organismo huésped previsto, en una forma adecuada para su integración en el ADN genómico de la célula huésped prevista o en una forma adecuada para replicación, mantenimiento y/o herencia independiente en el organismo huésped previsto. Por ejemplo, los constructos genéticos de la invención pueden estar en forma de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir un vector que puede proporcionar expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo en una célula huésped, organismo huésped y/o sistema de expresión adecuado).

En una realización preferida pero no limitativa, un constructo genético de la invención comprende

- a) al menos un ácido nucleico de la invención; operativamente conectado a
- b) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado;
- c) y opcionalmente también
- d) uno o más elementos adicionales de constructos genéticos conocidos *per se*;

en el que los términos “elemento regulador”, “promotor”, “terminador” y “operativamente conectado” tienen su significado habitual en la técnica (tal como se describe adicionalmente a continuación); y en el que dichos “elementos adicionales” presentes en los constructos genéticos pueden ser por ejemplo secuencias de UTR en 3' o 5', secuencias líder, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes indicadores, y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficacia de) transformación o integración. Estos y otros elementos adecuados para tales constructos genéticos quedarán claros para el experto, y pueden depender por ejemplo del tipo de constructo usado, la célula huésped u organismo huésped previsto; la manera en la que las secuencias de nucleótidos de la invención de interés van a expresarse (por ejemplo por medio de expresión constitutiva, transitoria o inducible); y/o la técnica de transformación que va a usarse.

Preferiblemente, en los constructos genéticos de la invención, dicho al menos un ácido nucleico de la invención y dichos elementos reguladores, y opcionalmente dichos uno o más elementos adicionales, están “operativamente unidos” entre sí, mediante lo cual quiere decirse generalmente que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor se considera “operativamente unido” a una secuencia codificante si dicho promotor puede iniciar o controlar/regular de otra forma la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en el que dicha secuencia codificante debe entenderse como que está “bajo el control de” dicho promotor). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótidos están operativamente unidas, estarán en la misma orientación y habitualmente también en el mismo marco de lectura. Habitualmente también estarán esencialmente contiguas, aunque esto también puede que no se requiera.

Preferiblemente, los elementos reguladores y adicionales de los constructos genéticos de la invención son tales que pueden proporcionar su función biológica prevista en la célula huésped u organismo huésped previsto.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser “*operable*” en la célula huésped u organismo huésped previsto, mediante lo cual quiere decirse que (por ejemplo) dicho promotor debe poder iniciar o controlar/regular de otra forma la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo una secuencia codificante, a la que está operativamente unido (tal como se define en el presente documento).

Algunos promotores particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotores conocidos *per se* para la expresión en células bacterianas, tales como los mencionados más adelante en el presente documento y/o los usados en los ejemplos.

Un marcador de selección debe ser tal que permite, es decir en condiciones de selección apropiadas, que células huésped y/o organismos huésped que se han transformado (satisfactoriamente) con la secuencia de nucleótidos de la invención se distingan de las células/organismos huésped que no se han transformado (satisfactoriamente). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales marcadores son genes que proporcionan resistencia contra antibióticos (tales como kanamicina o ampicilina), genes que proporcionan resistencia a la temperatura o genes que permiten que la célula huésped u organismo huésped se mantenga en ausencia de determinados factores, compuestos y/o componentes (alimenticios) en el medio que son esenciales para la supervivencia de las células u organismos no transformados.



Una secuencia líder debe ser tal que, en la célula huésped u organismo huésped previsto, permite las modificaciones postraduccionales deseadas y/o tal que dirige el ARNm transcrito a una parte u orgánulo deseado de una célula. Una secuencia líder puede permitir también la secreción del producto de expresión a partir de dicha célula. Como tal, la secuencia líder puede ser cualquier pro, pre o preprosecuencia operable en la célula huésped u organismo huésped. Pueden no requerirse secuencias líder para la expresión en una célula bacteriana.

Un marcador de expresión o gen indicador debe ser tal que, en la célula huésped u organismo huésped, permite la detección de la expresión de (un gen o secuencia de nucleótidos presente en) el constructo genético. Un marcador de expresión puede permitir también opcionalmente la localización del producto expresado, por ejemplo en una parte u orgánulo específico de una célula y/o en (un/a) célula(s), tejido(s), órgano(s) o parte(s) específico(s) de un organismo multicelular. Tales genes indicadores pueden expresarse también como una fusión proteica con la secuencia de aminoácidos de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos incluyen proteínas fluorescentes tales como GFP.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de promotores, terminadores y elementos adicionales adecuados incluyen los usados en los ejemplos más adelante. Para algunos ejemplos (adicionales) no limitativos de los promotores, marcadores de selección, secuencias líder, marcadores de expresión y elementos adicionales que pueden estar presentes/usarse en los constructos genéticos de la invención, tales como terminadores, potenciadores de la transcripción y/o traducción y/o factores de integración, se hace referencia a los manuales generales tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.* mencionados anteriormente, así como a los ejemplos que se facilitan en los documentos WO 95/07463, WO 96/23810, WO 95/07463, WO 95/21191, WO 97/11094, WO 97/42320, WO 98/06737, WO 98/21355, US-A-6.207.410, US-A-5.693.492 y EP 1 085 089. Otros ejemplos quedarán claros para el experto. Se hace referencia también a los antecedentes generales de la técnica citados anteriormente y las referencias adicionales citadas a continuación en el presente documento.

Los constructos genéticos de la invención pueden proporcionarse generalmente uniéndose adecuadamente la(s) secuencia(s) de nucleótidos de la invención con el uno o más elementos adicionales descritos anteriormente, por ejemplo usando las técnicas descritas en los manuales generales tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente.

A menudo, los constructos genéticos de la invención se obtendrán insertando una secuencia de nucleótidos de la invención en un vector adecuado (expresión) conocido *per se*. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de vectores de expresión adecuados son los usados en los ejemplos más adelante, así como los mencionados a continuación.

Los ácidos nucleicos de la invención y/o los constructos genéticos de la invención pueden usarse para transformar una célula huésped u organismo huésped, es decir para la expresión y/o producción del Nanobody o polipéptido de la invención. Los huéspedes o células huésped adecuados quedarán claros para el experto, y pueden ser por ejemplo cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota, por ejemplo:

- una cepa bacteriana, incluyendo pero sin limitarse a cepas Gram-negativas tales como cepas de *Escherichia coli*; de *Proteus*, por ejemplo de *Proteus mirabilis*; de *Pseudomonas*, por ejemplo de *Pseudomonas fluorescens*; y cepas Gram-positivas tales como cepas de *Bacillus*, por ejemplo de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por ejemplo de *Streptomyces lividans*; de *Staphylococcus*, por ejemplo de *Staphylococcus carnosus*; y de *Lactococcus*, por ejemplo de *Lactococcus lactis*;

- una célula fúngica, incluyendo pero sin limitarse a células de especies de *Trichoderma*, por ejemplo de *Trichoderma reesei*; de *Neurospora*, por ejemplo de *Neurospora crassa*; de *Sordaria*, por ejemplo de *Sordaria macrospora*; de *Aspergillus*, por ejemplo de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus sojae*; o de otros hongos filamentosos;

- una célula de levadura, incluyendo pero sin limitarse a células de especies de *Saccharomyces*, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*; de *Schizosaccharomyces*, por ejemplo de *Schizosaccharomyces pombe*; de *Pichia*, por ejemplo de *Pichia pastoris* o de *Pichia methanolica*; de *Hansenula*, por ejemplo de *Hansenula polymorpha*; de *Kluyveromyces*, por ejemplo de *Kluyveromyces lactis*; de *Arxula*, por ejemplo de *Arxula adenivorans*; de *Yarrowia*, por ejemplo de *Yarrowia lipolytica*;

- una célula o línea celular de anfibios, tal como *Xenopus oocytes*;

- una célula o línea celular derivada de insectos, tal como células/líneas celulares derivadas de lepidópteros, incluyendo pero sin limitarse a células de *Spodoptera* SF9 y Sf21 o células/líneas celulares derivadas de *Drosophila*, tales como células Schneider y Kc;

- una planta o célula vegetal, por ejemplo en plantas de tabaco; y/o

- una célula o línea celular de mamíferos, por ejemplo derivada de una célula o línea celular derivada de un ser

humano, de los mamíferos incluyendo pero sin limitarse a células CHO, células BHK (por ejemplo células BHK-21) y células o líneas celulares humanas tales como células HeLa, COS (por ejemplo COS-7) y PER.C6;

así como otros huéspedes o células huésped conocidos *per se* para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpo de (un solo) dominio y fragmentos ScFv), que quedarán claros para el experto. Se hace referencia también a los antecedentes generales de la técnica citados anteriormente en el presente documento, así como por ejemplo los documentos WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken *et al.*, (1998), citado anteriormente; Riechmann y Muyldermans, (1999), citado anteriormente; van der Linden, (2000), citado anteriormente; Thomassen *et al.*, (2002), citado anteriormente; Joosten *et al.*, (2003), citado anteriormente; Joosten *et al.*, (2005), citado anteriormente; y las referencias adicionales citadas en el presente documento.

Los Nanobodies y polipéptidos de la invención también pueden introducirse y expresarse en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo para propósitos profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo como terapia génica). Para este propósito, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden introducirse en las células o tejidos de cualquier modo adecuado, por ejemplo como tales (por ejemplo usando liposomas) o tras haberse insertado en un vector de terapia génica adecuado (por ejemplo derivado de retrovirus tales como adenovirus, o parvovirus tales como virus adenoasociado). Tal como quedará claro para el experto, tal terapia génica puede realizarse *in vivo* y/o *in situ* en el cuerpo de un paciente administrando un ácido nucleico de la invención o un vector de terapia génica adecuado que codifica el mismo en el paciente o en células específicas o un órgano o tejido específico del paciente; o pueden tratarse *in vitro* células adecuadas (a menudo tomadas del cuerpo del paciente que va a tratarse, tales como linfocitos explantados, aspirados de médula ósea o biopsias tisulares) con una secuencia de nucleótidos de la invención y luego (re)introducirse adecuadamente en el cuerpo el paciente. Todo esto puede realizarse usando vectores, técnicas y sistemas de administración de terapia génica que conoce bien el experto, por ejemplo Culver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, Nueva York, N.Y). Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91; (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documentos WO 94/29469; WO 97/00957, US 5.580.859; 1 US 5.589.546; o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Por ejemplo, se ha descrito en la técnica la expresión *in situ* de fragmentos ScFv (Afanasyeva *et al.*, Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) y de diacuerpos (Blanco *et al.*, J. Immunol, 171, 1070-1077 (2003)).

Para la expresión de los Nanobodies en una célula, pueden expresarse también como los denominados "intracuerpos", tal como se describe por ejemplo en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618 y US-A-7004940; WO 03/014960; en Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes y Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.

Para la producción, los Nanobodies y polipéptidos de la invención pueden producirse también por ejemplo en la leche de mamíferos transgénicos, por ejemplo en la leche de conejos, vacas, cabras u ovejas (véanse por ejemplo los documentos US-A-6.741.957, US-A-6.304.489 y US-A-6.849.992 para técnicas generales para introducir transgenes en mamíferos), en plantas o partes de plantas incluyendo pero sin limitarse a sus hojas, flores, frutos, semillas, raíces o tubérculos (por ejemplo en tabaco, maíz, soja o alfalfa) o en por ejemplo pupas del gusano *Bombix mori*.

Además, los Nanobodies y polipéptidos de la invención también pueden expresarse y/o producirse en sistemas de expresión libres de células, y los ejemplos adecuados de tales sistemas quedarán claros para el experto. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos incluyen la expresión en el sistema de germen de trigo; en lisados de reticulocitos de conejo; o en el sistema de *E. coli* Zubay.

Tal como se mencionó anteriormente, una de las ventajas del uso de Nanobodies es que los polipéptidos basados en los mismos pueden prepararse a través de expresión en un sistema bacteriano adecuado, y los sistemas de expresión bacterianos, vectores, células huésped, elementos reguladores, etc. adecuados, quedarán claros para el experto, por ejemplo a partir de las referencias citadas anteriormente. Sin embargo, debe indicarse que la invención en su sentido más amplio no se limita a la expresión en sistemas bacterianos.

Preferiblemente, en la invención, se usa un sistema de expresión (*in vivo* o *in vitro*), tal como un sistema de expresión bacteriano, que proporciona los polipéptidos de la invención en una forma que es adecuada para uso farmacéutico, y tales sistemas de expresión quedarán claros de nuevo para el experto. Tal como quedará claro para el experto, pueden prepararse polipéptidos de la invención adecuados para uso farmacéutico usando técnicas para la síntesis de péptidos.

Para la producción a escala industrial, los huéspedes heterólogos preferidos para la producción (industrial) de Nanobodies o productos terapéuticos proteicos que contienen Nanobodies incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* que son adecuadas para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para la

expresión/producción/fermentación farmacéutica a gran escala. Los ejemplos adecuados de tales cepas quedarán claros para el experto. Tales cepas y sistemas de producción/expresión también pueden estar disponibles de empresas tales como Biovitrum (Uppsala, Suecia).

5 Alternativamente, pueden usarse líneas celulares de mamífero, en particular células de ovario de hámster chino (CHO), para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para la expresión/producción/fermentación farmacéutica a gran escala. De nuevo, tales sistemas de expresión/producción también pueden estar disponibles de las empresas mencionadas anteriormente.

10 La elección del sistema de expresión específico dependería en parte del requisito de determinadas modificaciones postraduccionales, más específicamente la glicosilación. La producción de una proteína recombinante que contiene Nanobodies para la que se desea o requiere glicosilación necesitaría el uso de huéspedes de expresión de mamíferos que tienen la capacidad de glicosilar la proteína expresada. En este sentido, quedará claro para el  
 15 experto que el patrón de glicosilación obtenido (es decir la clase, el número y la posición de los residuos unidos) dependerá de la célula o línea celular que se usa para la expresión. Preferiblemente, se usa o bien una célula humana o bien una línea celular (es decir conduciendo a una proteína que tiene esencialmente un patrón de glicosilación humano) u otra línea celular de mamífero que pueden proporcionar un patrón de glicosilación que es esencialmente y/o funcionalmente el mismo que la glicosilación humana o al menos imita la glicosilación humana. Generalmente, huéspedes procariotas tales como *E. coli* no tienen la capacidad de glicosilar proteínas, y el uso de  
 20 eucariotas inferiores tales como levaduras habitualmente conduce a un patrón de glicosilación que difiere de la glicosilación humana. No obstante, debe entenderse que todas las células huésped y sistemas de expresión anteriores pueden usarse en la invención, dependiendo del Nanobody o proteína deseado que va a obtenerse.

25 Por tanto, según una realización no limitativa de la invención, el Nanobody o polipéptido de la invención está glicosilado. Según otra realización no limitativa de la invención, el Nanobody o polipéptido de la invención no está glicosilado.

Según una realización preferida, pero no limitativa de la invención, el Nanobody o polipéptido de la invención se produce en una célula bacteriana, en particular una célula bacteriana adecuada para producción farmacéutica a gran  
 30 escala, tal como células de las cepas mencionadas anteriormente.

Según otra realización preferida, pero no limitativa de la invención, el Nanobody o polipéptido de la invención se produce en una célula de levadura, en particular una célula de levadura adecuada para producción farmacéutica a gran  
 35 escala, tal como células de las especies mencionadas anteriormente.

Según aún otra realización preferida, pero no limitativa de la invención, el Nanobody o polipéptido de la invención se produce en una célula de mamífero, en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana, y más en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana que es adecuada para producción farmacéutica a gran escala, tal como las líneas celulares mencionadas anteriormente en el presente  
 40 documento.

Cuando se usa la expresión en una célula huésped para producir los Nanobodies y la proteínas de la invención, los Nanobodies y proteínas de la invención pueden producirse o bien intracelularmente (por ejemplo en el citosol, en el periplasma o en cuerpos de inclusión) y luego aislarse de las células huésped y purificarse además opcionalmente; o  
 45 pueden producirse extracelularmente (por ejemplo en el medio en el que las células huésped se cultivan) y luego aislarse del medio de cultivo y además opcionalmente purificarse. Cuando se usan células huésped eucariotas, se prefiere habitualmente la producción extracelular puesto que esto facilita considerablemente el aislamiento adicional y procesamiento posterior de los Nanobodies y proteínas obtenidos. Células bacterianas tales como las cepas de *E. coli* mencionadas anteriormente no secretan normalmente proteínas de manera extracelular, excepto por unas pocas clases de proteínas tales como toxinas y hemolisina, y la producción secretora en *E. coli* se refiere a la translocación de proteínas a través de la membrana interna hacia el espacio periplásmico. La producción periplásmica proporciona varias ventajas con respecto a la producción citosólica. Por ejemplo, la secuencia N-terminal de los aminoácidos del producto secretado puede ser idéntica al producto génico natural tras la escisión de la secuencia señal de secreción por una peptidasa específica de señal. Además, parece haber mucha menos actividad proteasa en el periplasma  
 55 que en el citoplasma. Además, la purificación de proteínas es más sencilla debido a menos proteínas contaminantes en el periplasma. Otra ventaja es que pueden formarse puentes disulfuro correctos porque el periplasma proporciona un entorno más oxidativo que el citoplasma. Las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* se encuentran a menudo en agregados insolubles, los denominados cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión pueden estar ubicados en el citosol o en el periplasma; la recuperación de proteínas biológicamente activas a partir de estos cuerpos de inclusión requiere un proceso de desnaturalización/replegamiento. Muchas proteínas recombinantes, incluyendo proteínas terapéuticas, se recuperan de cuerpos de inclusión. Alternativamente, tal como quedará claro para el  
 60 experto, pueden usarse cepas recombinantes de bacterias que se han modificado genéticamente para secretar una proteína deseada, y en particular un Nanobody o un polipéptido de la invención.

65 Por tanto, según una realización no limitativa de la invención, el Nanobody o polipéptido de la invención es un Nanobody o polipéptido que se ha producido intracelularmente y que se ha aislado de la célula huésped, y en

particular de una célula bacteriana o de un cuerpo de inclusión en una célula bacteriana. Según otra realización no limitativa de la invención, el Nanobody o polipéptido de la invención es un Nanobody o polipéptido que se ha producido extracelularmente, y que se ha aislado del medio en el que se cultiva la célula huésped.

5 Algunos promotores preferidos, pero no limitativos para su uso con estas células huésped incluyen,

10 - para la expresión en *E. coli*: promotor lac (y derivados del mismo tales como el promotor lacUV5); promotor de arabinosa; promotor izquierdo (PL) y derecho (PR) del fago lambda; promotor del operón trp; promotores lac/trp híbridos (tac y trc); promotor de T7 (más específicamente el del gen 10 del fago T7) y otros promotores del fago T; promotor del gen de resistencia a tetraciclina de Tn10; variantes modificadas por ingeniería genética de los promotores anteriores que incluyen una o más copias de una secuencia operadora reguladora extraña;

15 - para la expresión en *S. cerevisiae*: constitutivos: ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), ENO (enolasa), CYC1 (citocromo c iso-1), GAPDH (gliceraldehidos-3-fosfato deshidrogenasa); PGK1 (fosfoglicerato cinasa), PYK1 (piruvato cinasa); regulados: GAL1.10.7 (enzimas metabólicas de galactosa), ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2), PHO5 (fosfatasa ácida), CUP1 (metalotioneína de cobre); heterólogos: CaMV (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor);

20 - para la expresión en *Pichia pastoris*: el promotor de AOX1 (alcohol oxidasa I)

25 - para la expresión en células de mamíferos: potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV); variante de promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV) que contiene dos secuencias de operador de tetraciclina de manera que el promotor puede regularse por el represor Tet; promotor de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple; promotor/potenciador de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (LTR del VSR); promotor de factor de elongación 1 $\alpha$  (hEF-1 $\alpha$ ) de ser humano, chimpancé, ratón o rata; el promotor temprano de SV40; el promotor de la repetición terminal larga de VIH-1; promotor de  $\beta$ -actina.

Algunos vectores preferidos, pero no limitativos para su uso con estas células huésped incluyen:

30 - vectores para la expresión en células de mamíferos: pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC37199), pRSVneo (ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565), así como sistemas de expresión basados en virus, tales como los basados en adenovirus;

35 - vectores para la expresión en células bacterianas: vectores pET (Novagen) y vectores pQE (Qiagen);

40 - vectores para la expresión en células de levadura u otras células fúngicas: pYES2 (Invitrogen) y vectores de expresión en *Pichia* (Invitrogen);

- vectores para la expresión en células de insecto: pBlueBacII (Invitrogen) y otros vectores de baculovirus

45 - vectores para la expresión en plantas o células vegetales: por ejemplo vectores basados en virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco, cepas adecuadas de *Agrobacterium* o vectores basados en plásmido Ti.

Algunas secuencias secretoras preferidas, pero no limitativas para su uso con estas células huésped incluyen:

50 - para su uso en células bacterianas tales como *E. coli*: PelB, Bla, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, StII, PhoA, PhoE, MalE, Lpp, LamB, y similares; péptido señal TAT, señal de secreción C-terminal de hemolisina

- para su uso en levaduras: preprosecuencia de factor de acoplamiento  $\alpha$ , fosfatasa (phoI), invertasa (Suc), etc.;

55 - para su uso en células de mamíferos: señal indígena en caso de que la proteína diana sea de origen eucariota; péptido señal VJ2-C de cadena  $\kappa$  de Ig murina; etc.

Las técnicas adecuadas para transformar un huésped o célula huésped de la invención quedarán claras para el experto y pueden depender de la célula huésped/organismo huésped previsto y el constructo genético que va a usarse. Se hace de nuevo referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente.

60 Tras la transformación, puede realizarse una etapa para detectar y seleccionar las células huésped u organismos huésped que se han transformado satisfactoriamente con la secuencia de nucleótidos/constructo genético de la invención. Esta puede ser por ejemplo una etapa de selección basada en un marcador seleccionable presente en el constructo genético de la invención o una etapa que implica la detección de la secuencia de aminoácidos de la invención, por ejemplo usando anticuerpos específicos.

65 La célula huésped (que puede estar en forma de una línea celular estable) u organismos huésped (que pueden estar

en forma de una cepa o línea mutante estable) transformados forman aspectos adicionales de la presente invención.

Preferiblemente, estas células huésped u organismos huésped son tales que expresan, o son capaces (al menos) de expresar (por ejemplo en condiciones adecuadas), una secuencia de aminoácidos de la invención (y en caso de un organismo huésped: en al menos una célula, parte, tejido u órgano del mismo). La invención también incluye generaciones, progenie y/o descendientes adicionales de la célula huésped u organismo huésped de la invención, que pueden obtenerse por ejemplo mediante división celular o mediante reproducción sexual o asexual.

Para producir/obtener la expresión de las secuencias de aminoácidos de la invención, la célula huésped transformada u organismo huésped transformado puede conservarse, mantenerse y/o cultivarse en condiciones tales que la secuencia de aminoácidos (deseada) de la invención se expresa/produce. Las condiciones adecuadas quedarán claras para el experto y dependerán habitualmente de la célula huésped/organismo huésped usado, así como de los elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia de nucleótidos (relevante) de la invención. De nuevo, se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente en los párrafos sobre los constructos genéticos de la invención.

Generalmente, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada y opcionalmente la presencia de un compuesto o factor inductor adecuado (por ejemplo cuando las secuencias de nucleótidos de la invención están bajo el control de un promotor inducible); todo lo cual puede seleccionarlo el experto. De nuevo, en tales condiciones, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden expresarse de una manera constitutiva, de una manera transitoria o solo cuando se induzcan adecuadamente.

También quedará claro para el experto que la secuencia de aminoácidos de la invención puede generarse (en primer lugar) en una forma inmadura (tal como se mencionó anteriormente), que luego puede someterse a modificación postraducciona, dependiendo de la célula huésped/organismo huésped usado. Además, la secuencia de aminoácidos de la invención puede glicosilarse, de nuevo dependiendo de la célula huésped/organismo huésped usado.

La secuencia de aminoácidos de la invención puede aislarse entonces de la célula huésped/organismo huésped y/o del medio en el que dicha célula huésped u organismo huésped se cultivó, usando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas *per se*, tales como técnicas de cromatografía (preparativa) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo usando una secuencia de aminoácidos específica, escindible fusionada con la secuencia de aminoácidos de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir usando anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos que va a aislarse).

Generalmente, para uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención pueden formularse como una preparación farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Por medio de ejemplos no limitativos, una formulación de este tipo puede estar en una forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica, para administración mediante inhalación, mediante un parche cutáneo, mediante un implante, mediante un supositorio, etc. Tales formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la manera de administración, así como métodos y portadores para su uso en la preparación de las mismas, quedarán claros para el experto, y se describen adicionalmente a continuación en el presente documento.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un Nanobody de la invención o al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador adecuado (es decir un portador adecuado para uso veterinario), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

Una realización de la presente invención es un constructo de polipéptido que comprende: al menos un Nanobody de la invención, es decir dirigido contra cualquiera de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, dominio A3 de vWF.

Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente, en el que el Nanobody de la invención dirigido contra el dominio A1 de vWF activado reconoce específicamente la conformación activada de vWF en el sitio de la formación de trombos pero no se une a formas inactivadas circulantes de vWF.

Los Nanobodies de la invención pueden estar también dirigidos contra un fragmento de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, dominio A3 de vWF, tal como un fragmento capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Una diana es también un fragmento de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, dominio A3 de vWF, capaz de unirse a un Nanobody de la invención generado contra la diana de longitud completa "original".

Un fragmento tal como se usa en el presente documento se refiere a menos del 100 % de la secuencia (por ejemplo,

el 99 %, el 90 %, el 80 %, el 70 %, el 60 %, el 50 %, el 40 %, el 30 %, el 20 %, el 10 % etc.), pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. Un fragmento es de longitud suficiente de manera que la interacción de interés se mantiene con una afinidad de  $1 \times 10^{-6}$  M o mejor.

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

Un Nanobody de la invención dirigido contra una diana significa generalmente un Nanobody de la invención que es capaz de unirse a su diana con una afinidad mejor de  $10^{-6}$  M.

15 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente en el que al menos un Nanobody de la invención es una secuencia humanizada.

Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente en el que al menos un Nanobody de la invención es un anticuerpo  $V_{HH}$  de camélido.

20 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente, en el que dicho Nanobody de la invención es una secuencia homóloga, una porción funcional o una porción funcional de una secuencia homóloga del Nanobody de longitud completa de la invención.

25 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente, en el que dicho constructo de polipéptido es una secuencia homóloga de dicho constructo de polipéptido, una porción funcional del mismo o una secuencia homóloga de una porción funcional del mismo.

30 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente, que comprende además al menos un Nanobody de la invención dirigido contra una o más proteínas séricas, en particular una o más proteínas séricas humanas.

Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente en el que dicha al menos una proteína sérica (humana) es cualquiera de albúmina sérica (humana), inmunoglobulinas séricas (humanas), proteína de unión a tiroxina (humana), transferrina (humana) o fibrinógeno (humano) o un fragmento de los mismos.

35 Según un aspecto específico, pero no limitativo de la invención, los polipéptidos de la invención contienen, además del uno o más Nanobodies de la invención, al menos un Nanobody contra albúmina sérica humana. Aunque estos Nanobodies contra albúmina sérica humana pueden ser tal como se describe generalmente en el documento W04/062551 o en las referencias adicionales citadas en el mismo, según una realización particularmente preferida, pero no limitativa, dicho Nanobody contra albúmina sérica humana consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

45 i) CDR1 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

SFGMS [SEQ ID NO: 44]

LNLMG [SEQ ID NO: 45]

50 INLLG [SEQ ID NO: 46]

NYWMY; [SEQ ID NO: 47]

55 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

60 (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no delecciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;

y en el que:

65 ii) CDR2 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                 |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|    | SISGSGSDTLYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 48] |
| 5  | TITVG DSTNYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 49] |
|    | TITVG DSTSYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 50] |
|    | SINGRGDDTRYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 51] |
| 10 | AISADSSTKNYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 52] |
|    | AISADSSDKRYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [SEQ ID NO: 53] |
| 15 | RISTGGGYSYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [SEQ ID NO: 54] |
|    | o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en las que |                 |
| 20 | (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o                                                                                                                                                                                        |                 |
| 25 | (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;                                                                                                                                       |                 |
|    | y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:                                                                                                                   |                 |
| 30 | (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o                                                                                                                                                                                        |                 |
|    | (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;                                                                                                                                       |                 |
| 35 | y en el que:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                 |
|    | iii) CDR3 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:                                                                                                                                                                                                                                                                    |                 |
| 40 | DREAQVDTLDFDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | [SEQ ID NO: 55] |
|    | o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en las que |                 |
| 45 | (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o                                                                                                                                                                                        |                 |
| 50 | (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;                                                                                                                                       |                 |
|    | y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:                                                                                                                   |                 |
| 55 | (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o                                                                                                                                                                                        |                 |
|    | (2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;                                                                                                                                       |                 |
| 60 | o del grupo que consiste en:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                 |
|    | GGSLSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | [SEQ ID NO: 56] |
| 65 | RRTWHSEL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | [SEQ ID NO: 57] |

GRSVSRS

[SEQ ID NO: 58]

GRGSP

[SEQ ID NO: 59]

5

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

10

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores.

15

En otro aspecto, la invención se refiere a un Nanobody contra albúmina sérica humana, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), que se elige del grupo que consiste en Nanobodies con una de las siguientes combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente:

20

- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** SISGSGSDTLYADSVKG; **CDR3:** GGSLSR;

- **CDR1:** LNLMG; **CDR2:** TITVG DSTNYADSVKG; **CDR3:** RRTWHSEL;

25

- **CDR1:** INLLG; **CDR2:** TITVG DSTSYADSVKG; **CDR3:** RRTWHSEL;

- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** SINGRGDDTRYADSVKG; **CDR3:** GRSVSRS;

- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** AISADSSDKRYADSVKG; **CDR3:** GRGSP;

30

- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** AISADSSDKRYADSVKG; **CDR3:** GRGSP;

- **CDR1:** NYWMY; **CDR2:** RISTGGGYSSYADSVKG; **CDR3:** DREAQVDTLDFDY.

35

En los Nanobodies de la invención que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas anteriormente, cada CDR puede reemplazarse por una CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con las CDR mencionadas; en las que

40

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;

45

y/o elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 (tal como se indica en el párrafo precedente) "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con la(s) CDR mencionada(s) una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

50

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos contiene solo preferiblemente sustituciones de aminoácidos, y no deleciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores.

55

Sin embargo, de los Nanobodies de la invención que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas anteriormente, se prefieren particularmente Nanobodies que comprenden una o más de las CDR enumeradas anteriormente; se prefieren más particularmente Nanobodies que comprenden dos o más de las CDR enumeradas anteriormente; y se prefieren lo más particularmente Nanobodies que comprenden tres de las CDR enumeradas anteriormente.

60

En estos Nanobodies contra albúmina sérica humana, las regiones de entramado FR1 a FR4 son preferiblemente tal como se definió anteriormente en el presente documento para los Nanobodies de la invención.

65

Se eligen Nanobodies particularmente preferidos contra albúmina sérica humana del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107-121. Estos corresponden a los Nanobodies contra albúmina sérica humana de SEQ ID NO: 61 a 67, SEQ



ID NO 87 a 89 y SEQ ID NO 100-104 de la solicitud provisional estadounidense en tramitación junto con la presente del solicitante titulada *"Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha"* (Nanobodies™ mejorados contra el factor de necrosis tumoral alfa) con fecha de presentación de 18 de mayo de 2005.

5 Más generalmente, se describen Nanobodies contra albúmina sérica adecuados para su uso en la invención en la solicitud internacional del solicitante titulada "Serum albumin binding proteins" con fecha de presentación internacional de 17 de mayo de 2006.

10 Otra realización de la presente invención es un ácido nucleico que codifica un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente.

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

15 Otra realización de la presente invención es una composición tal como se describió anteriormente en la que dicho agente trombolítico es cualquiera de estafilocinasa, activador de plasminógeno tisular, estreptocinasa, estreptocinasa de cadena sencilla, urocinasa y complejo de acil-plasminógeno-estreptocinasa.

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

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

30 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente o un uso de un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente en el que dichos trastornos son cualquiera que surja de ataque isquémico cerebral transitorio, angina inestable o estable, angina de pecho, infarto cerebral, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis, injerto de derivación coronaria, o valvuloplastia de arterias coronarias e intervenciones coronarias tales como angioplastia, colocación de endoprótesis, endarterectomía carotídea o aterectomía.

35 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente o un uso de un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente en el que dichos trastornos son cualquiera de la formación de un trombo no oclusivo, la formación de un trombo oclusivo, formación de trombos arteriales, oclusión coronaria aguda, reestenosis, reestenosis tras PCTA o colocación de endoprótesis, formación de trombos en arterias estenosadas, hiperplasia tras angioplastia, aterectomía o arterial colocación de endoprótesis, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de arterias enfermas.

40 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente o un uso de un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente en el que dicho trastorno es formación de placas o trombos en entornos de alta cizalladura.

45 Otra realización de la presente invención es un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente o un uso de un constructo de polipéptido, ácido nucleico o composición tal como se describió anteriormente en el que dicho constructo de polipéptido se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

50 Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente o un ácido nucleico que codifica dicho constructo de polipéptido, o una composición tal como se describió anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Otra realización de la presente invención es un método de producción de un polipéptido tal como se describió anteriormente, que comprende

(a) cultivar células huésped que comprenden ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido tal como se describió anteriormente en condiciones que permiten la expresión del polipéptido, y,

60 (b) recuperar el polipéptido producido a partir del cultivo.

Otra realización de la presente invención es un método tal como se describió anteriormente, en el que dichas células huésped son bacterianas o de levaduras.

5 Otra realización de la presente invención es un método para tratar dispositivos médicos invasivos para prevenir la agregación mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión que comprende la etapa de recubrir dicho dispositivo con un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente.

10 Otra realización de la presente invención es un dispositivo médico invasivo para sortear la agregación mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión, en el que dicho dispositivo está recubierto con un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente.

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

15 (a) poner en contacto un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente con un polipéptido correspondiente a su diana, o un fragmento del mismo, en presencia y ausencia de un modulador candidato en condiciones que permiten la unión entre dichos polipéptidos, y

20 (b) medir la unión entre los polipéptidos de la etapa (a), en el que una disminución en la unión en presencia de dicho modulador candidato, en relación con la unión en ausencia de dicho modulador candidato identificó a dicho modulador candidato como agente que modula la agregación mediada por plaquetas.

25 Otra realización de la presente invención es un kit para examinar agentes que modulan la agregación mediada por plaquetas según el método tal como se describió anteriormente.

Otra realización de la presente invención es un agente desconocido que modula la agregación mediada por plaquetas identificado según el método tal como se describió anteriormente.

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

(a) poner en contacto una muestra con un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente, y

35 (b) detectar la unión de dicho constructo de polipéptido a dicha muestra, y

(c) comparar la unión detectada en la etapa (b) con un patrón, en el que una diferencia en la unión en relación con dicha muestra es diagnóstico de una enfermedad o un trastorno caracterizado por disfunción de la agregación mediada por plaquetas.

40 Otra realización de la presente invención es un kit para examinar el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno caracterizado por disfunción de la agregación mediada por plaquetas según el método tal como se describió anteriormente.

45 Otra realización de la presente invención es un kit tal como se describió anteriormente que comprende un constructo de polipéptido tal como se describió anteriormente.

50 En los polipéptidos de la invención, los uno o más Nanobodies de la invención que están dirigidos contra una diana pueden ser de la misma secuencia. Alternativamente pueden no tener todos la misma secuencia. Está dentro del alcance de la invención que un polipéptido de la invención comprenda Nanobodies anti-diana de la invención que no comparten todos la misma secuencia, pero que están dirigidos contra la misma diana, o fragmento de la misma, uno o más antígenos de la misma.

55 Otro aspecto de la invención es que el polipéptido de la invención comprende dos o más Nanobodies de la invención, en el que dos cualesquiera Nanobodies de la invención están dirigidos contra diferente epítomos/dianas, es decir contra cualquiera de vWF, dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado, dominio A3 de vWF.

60 Otro aspecto de la invención es un polipéptido biespecífico de la invención que comprende un Nanobody de la invención dirigido contra el dominio A1 de vWF, dominio A1 de vWF activado y otro Nanobody de la invención dirigido contra el dominio A3 de vWF. Dicho polipéptido biespecífico de la invención inhibe la interacción entre vWF y colágeno, y la interacción entre vWF y plaquetas.

65 Según un aspecto de la presente invención un polipéptido de la invención puede comprender dos o más Nanobodies de la invención que se han unido. Los Nanobodies de la invención pueden ser idénticos en secuencia y dirigidos contra la misma diana o antígeno. Dependiendo del número de  $V_{HH}$  unidos, un  $V_{HH}$  multivalente puede ser bivalente ( $2 V_{HH}$ ), trivalente ( $3 V_{HH}$ ), tetravalente ( $4 V_{HH}$ ) o tener moléculas de valencia superior.

La presente invención también se refiere al hallazgo de que un polipéptido de la invención que comprende además uno o más Nanobodies de la invención cada uno dirigido contra una proteína sérica de un sujeto, sorprendentemente tiene una semivida significativamente prolongada en la circulación de dicho sujeto en comparación con la semivida del Nanobody anti-diana de la invención cuando no forma parte de dicho constructo.

Además, se encontró que dichos constructos presentaban las mismas propiedades favorables de  $V_{HH}$  tales como alta estabilidad permaneciendo intactos en ratones, resistencia al pH extrema, alta estabilidad a la temperatura y alta afinidad por la diana.

La proteína sérica puede ser cualquier proteína adecuada encontrada en el suero del sujeto, o fragmento de la misma. En un aspecto de la invención, la proteína sérica es albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. Dependiendo del uso previsto tal como la semivida requerida para un tratamiento y/o compartimentalización eficaces del antígeno diana, la pareja de  $V_{HH}$  puede estar dirigida a una de las proteínas séricas anteriores.

Tales constructos son capaces de circular en el suero del sujeto durante varios días, reduciendo la frecuencia de tratamiento, la incomodidad para el sujeto y dando como resultado un coste disminuido del tratamiento. Además, un aspecto de la invención es que la semivida del polipéptido de la invención divulgado en el presente documento puede controlarse mediante el número de Nanobodies anti-proteína sérica de la invención presentes en el constructo. Una semivida controlable es deseable en varias circunstancias, por ejemplo, en la aplicación de una dosis programada de un polipéptido terapéutico de la invención.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido de la invención tal como se menciona en el presente documento, que comprende además un agente trombolítico.

Dicho agente trombolítico puede estar unido de manera no covalente o covalente a un Nanobody de la invención por medio de enlaces covalentes o no covalentes. Tales medios covalentes se describen más adelante. Los medios no covalentes incluyen por medio de una interacción proteica tal como biotina/estreptavidina, o por medio de un inmunoconjugado.

Alternativamente, el agente trombolítico puede administrarse de manera simultánea, separada o secuencial con respecto a un polipéptido de la invención.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende al menos un polipéptido de la invención y al menos un agente trombolítico, para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.

Un aspecto de la invención es un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de al menos un polipéptido de la invención y al menos un agente trombolítico, simultáneamente, por separado o secuencialmente.

Otro aspecto de la invención es un kit que contiene al menos un polipéptido de la invención y al menos un agente trombolítico para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto. Un aspecto de la invención es que el kit puede usarse según la invención. Un aspecto de la invención es que el kit puede usarse para tratar las enfermedades citadas en el presente documento.

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

Por administración separada quiere decirse que el polipéptido y el agente trombolítico se administran a un sujeto al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo. Los componentes están presentes en el kit como preparaciones separadas, no mezcladas. Por ejemplo, el polipéptido y el agente trombolítico pueden estar presentes en el kit como comprimidos individuales. Los comprimidos pueden administrarse al sujeto tragando ambos comprimidos al mismo tiempo, o un comprimido directamente tras el otro.

Por administración secuencial quiere decirse que el polipéptido y el agente trombolítico se administran a un sujeto secuencialmente. El polipéptido y el agente trombolítico están presentes en el kit como preparaciones separadas, no mezcladas. Hay un intervalo de tiempo entre las dosis. Por ejemplo, un componente podría administrarse hasta 336, 312, 288, 264, 240, 216, 192, 168, 144, 120, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1 o 0,5 horas después del otro componente.

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

Los usos médicos del polipéptido de la invención descritos a continuación también se aplican a la composición que

comprende un polipéptido de la invención y al menos un agente trombolítico de polipéptido, para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto tal como se divulgó anteriormente en el presente documento.

Los agentes trombolíticos según la invención pueden incluir, por ejemplo, estafilocinasa, activador de plasminógeno tisular, estreptocinasa, estreptocinasa de cadena sencilla, urocinasa y complejo de acil-plasminógeno-estreptocinasa.

Los Nanobodies de la invención pueden unirse para formar cualquier polipéptido de la invención divulgado en el presente documento que comprende más de un Nanobody de la invención usando métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden fusionarse mediante reticulación química haciendo reaccionar residuos de aminoácido con un agente de derivatización orgánico tal como describen Blattler *et al*, Biochemistry 24,1517-1524; documento EP294703. Alternativamente, el Nanobody de la invención puede fusionarse genéticamente al nivel del ADN, es decir un constructo de polinucleótido formado que codifica el polipéptido completo de la invención que comprende uno o más Nanobodies anti-diana de la invención y uno o más Nanobodies anti-proteína sérica de la invención. Se divulga un método para producir polipéptido de V<sub>HH</sub> bivalente o multivalente de la invención en la solicitud de patente PCT WO 96/34103. Un modo de unir múltiples Nanobodies de la invención es por medio de la ruta genética uniendo secuencias que codifican el Nanobody de la invención o bien directamente o bien por medio de un ligador peptídico. Por ejemplo, el extremo C-terminal del primer Nanobody de la invención puede unirse al extremo N-terminal del siguiente Nanobody de la invención. Este modo de unión puede extenderse con el fin de unir Nanobodies adicionales de la invención para la construcción y producción de constructos tri, tetra, etc. funcionales.

El polipéptido de la invención divulgado en el presente documento puede prepararlo el experto en la técnica según métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden obtenerse V<sub>HH</sub> usando métodos conocidos en la técnica tales como inmunizando a un camello y obteniendo hibridomas del mismo, o clonando una biblioteca de Nanobodies de la invención usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y selección posterior usando presentación en fagos.

Los Nanobodies tienen una estructura única que consiste en un único dominio variable. Las moléculas de V<sub>HH</sub> derivadas de anticuerpos de camélidos están entre los dominios de unión a antígeno intactos más pequeños conocidos (aproximadamente 15 kDa, o 10 veces más pequeños que una IgG convencional) y por tanto son muy adecuados para el suministro a tejidos densos y para acceder al espacio limitado entre macromoléculas que participan en o que inician el proceso de agregación mediada por plaquetas.

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

Los resultados de los experimentos de alta cizalladura indican que puede administrarse una dosis inferior a pacientes. Por tanto, se esperan menos efectos secundarios (tales como problemas de inmunogenicidad o hemorragias).

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

Otra realización de la presente invención es un polipéptido de la invención en el que el número de Nanobodies de la invención dirigidos a la misma diana es de dos o más.

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

Un aspecto no limitativo de la invención es que al menos un V<sub>HH</sub> dirigido al dominio A1 en un polipéptido heteroespecífico de la invención reconoce la conformación activa de vWF. Tal polipéptido de la invención puede tener efectos antitrombóticos superiores en comparación con los V<sub>HH</sub> monoméricos. Se realizaron experimentos de perfusión en una cámara de flujo, para estudiar la agregación plaquetaria bajo alta cizalladura para estudiar los efectos de estos polipéptidos de la invención.

El descubrimiento de Nanobodies que se producen de manera natural de la invención en llama, dromedario y camello reveló una nueva clase de moléculas terapéuticas que combinan las ventajas de los anticuerpos monoclonales, por ejemplo especificidad, baja toxicidad, con las ventajas de moléculas pequeñas, por ejemplo penetración tisular y estabilidad. Desafortunadamente, el desarrollo de productos terapéuticos apropiados basados

en estas proteínas tiene la desventaja de derivarse de camélidos, y por tanto no son humanos. Las proteínas no humanas contienen residuos de aminoácido que pueden ser inmunogénicos cuando se inyectan en un paciente humano. Aunque estudios han mostrado que  $V_{HH}$  derivados de camélidos no son inmunogénicos cuando se inyectan en ratones, es preferible reemplazar residuos de camélidos por residuos humanos. Estos polipéptidos humanizados deben ser sustancialmente no inmunogénicos en humanos, pero conservar la afinidad y actividad del polipéptido de tipo natural.

El resultado de la humanización es preferiblemente que la inmunogenicidad tras la administración en pacientes humanos es minoritaria o inexistente. La humanización de un polipéptido, según la presente invención, comprende una etapa de reemplazar uno o más de los aminoácidos de camélidos por su homólogo humano tal como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin que el polipéptido pierda su carácter típico, es decir la humanización no afecta significativamente a la capacidad de unión a antígeno del polipéptido resultante.

El documento WO 04/062551 y la descripción adicional en el presente documento describen algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de residuos de aminoácido del dominio variable de anticuerpo ( $V_{HH}$ ) que pueden modificarse sin disminuir la afinidad nativa del dominio por el antígeno y al tiempo que se reduce su inmunogenicidad con respecto a una especie heteróloga; el uso de  $V_{HH}$  que tienen modificaciones en los residuos identificados que son útiles para su administración a especies heterólogas; y al  $V_{HH}$  así modificado. Más específicamente, la invención también abarca la preparación de  $V_{HH}$  modificados, que se modifican para su administración a humanos, los propios  $V_{HH}$  resultantes y el uso de tales  $V_{HH}$  "humanizados" en el tratamiento de enfermedades en humanos.

Tal como se mencionó en el documento WO 04/062551 y en la descripción adicional en el presente documento, la humanización de polipéptidos de  $V_{HH}$  requiere la introducción y mutagénesis de solo un número limitado de aminoácidos en una única cadena de polipéptido sin pérdida drástica de actividad de unión y/o inhibición. Esto está en contraposición a la humanización de scFv, Fab, (Fab)<sub>2</sub> e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en dos cadenas, la cadena ligera y la pesada y la conservación del ensamblaje de ambas cadenas.

Una técnica de humanización puede realizarse mediante un método que comprende el reemplazo de cualquiera de los siguientes residuos o bien solo o bien en combinación: posiciones de FR1 1, 5, 28 y 30, el aminoácido distintivo en la posición 37, 44, 45 y 47 en FR2, residuos de FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94 y posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4; numeración según la numeración de Kabat.

Los Nanobodies de la invención tienen un alto grado de homología con el  $V_H$  de línea germinal humana DP-47. La humanización adicional también puede implicar la introducción y mutagénesis de una cantidad limitada de aminoácidos en una única cadena de polipéptido. Esto está en contraposición a la humanización de scFv, Fab, (Fab)<sub>2</sub> e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en dos cadenas, la cadena ligera y la pesada y la conservación del ensamblaje de ambas cadenas.

Los polipéptidos contienen residuos de tipo humano en FR2. La humanización también puede implicar la mutagénesis de residuos en FR1 en la posición 1 y 5 que se introdujeron mediante el cebador usado para la clonación del repertorio y no se producen de manera natural en la secuencia de llama. La mutagénesis de esos residuos no dio como resultado pérdida de actividad de unión y/o inhibición. La humanización de FR1 también requería mutagénesis de la posición 28 y 30. La mutagénesis de esos residuos tampoco dio como resultado pérdida de actividad de unión y/o inhibición.

La humanización también puede implicar la mutagénesis de residuos en FR3 en la posición 74, 75, 76, 83, 84, 93, 94. La mutagénesis de esos residuos no dio como resultado pérdida de actividad de unión y/o inhibición.

La humanización también puede implicar la mutagénesis de residuos en FR4 en la posición 104, 108 y 111. La mutagénesis de Q108L dio como resultado un menor nivel de producción en *Escherichia coli*. La posición 108 está expuesta al disolvente en  $V_{HH}$  de camélido, mientras que en anticuerpos humanos esta posición está enterrada en la superficie de contacto  $V_H$ - $V_L$  (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). En  $V_H$  aislados la posición 108 está expuesta al disolvente. La introducción de una Leu hidrófoba no polar en lugar de Gln no cargada polar puede tener un efecto drástico sobre la estabilidad/capacidad de plegado intrínseca de la molécula.

Una realización de la presente invención es un método para humanizar un  $V_{HH}$  que comprende las etapas de:

(a) reemplazar cualquiera de los siguientes residuos o bien solos o bien en combinación:

posiciones de FR1 1, 5, 28 y 30,

el aminoácido distintivo en la posición 37, 44, 45 y 47 en FR2,

los residuos de FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94,

y las posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4;

numeración según la numeración de Kabat.

- 5 Más adelante se facilitan ejemplos de tales secuencias humanizadas y en la lista de secuencias adjunta.

El uso de anticuerpos derivados de fuentes tales como ratón, oveja, cabra, conejo etc., y derivados humanizados de los mismos como tratamiento para estados que requieren una modulación de la agregación asociada a plaquetas, es problemático por varios motivos. Los anticuerpos tradicionales no son estables a temperatura ambiente, y tienen que refrigerarse para su preparación y almacenamiento, requiriendo equipo de laboratorio, almacenamiento y transporte necesariamente refrigerados, lo que contribuye al tiempo y el gasto. La refrigeración algunas veces no es viable en países en desarrollo. Los rendimientos de expresión de dichas moléculas de Fab son muy bajos y el método de producción es muy laborioso. Además, la fabricación o producción a pequeña escala de dichos anticuerpos es cara debido a que los sistemas celulares de mamíferos necesarios para la expresión de anticuerpos intactos y activos requieren altos niveles de apoyo en cuanto a tiempo y equipo, y los rendimientos son muy bajos. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende del pH, y por tanto no son adecuados para su uso en entornos fuera del intervalo de pH fisiológico habitual tal como, por ejemplo, en el tratamiento de hemorragia gástrica, cirugía gástrica. Además, los anticuerpos tradicionales son inestables a pH bajo o alto y por tanto no son adecuados para administración oral. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos de camélidos resisten condiciones duras, tales como pH extremo, agentes desnaturizantes y altas temperaturas (Ewert S *et al*, Biochemistry 19 de marzo de 2002; 41(11):3628-36), lo que los hace adecuados para suministro por administración oral. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende de la temperatura, y por tanto no son adecuados para su uso en ensayos o kits realizados a temperaturas fuera de los intervalos de temperatura biológicamente activa (por ejemplo  $37^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$ ).

Los Nanobodies y polipéptidos de la invención no solo presentan las características ventajosas de anticuerpos convencionales, tales como baja toxicidad y alta selectividad, sino que también presentan propiedades adicionales. Son más solubles, lo que significa que pueden almacenarse y/o administrarse en mayores concentraciones en comparación con anticuerpos convencionales. Son estables a temperatura ambiente, lo que significa que pueden prepararse, almacenarse y/o transportarse sin el uso de equipos de refrigeración, proporcionando ahorros en costes, tiempo y medioambientales. Otras características ventajosas en comparación con anticuerpos convencionales incluyen semivida corta en la circulación que puede modularse según la invención mediante, por ejemplo, acoplamiento de albúmina, un Nanobody biespecífico con una especificidad frente a albúmina y la otra frente a la diana, acoplamiento de Fc, acoplamiento de  $V_{HH}$  ( $V_{HH}$  bivalente) o mediante pegilación. Para procedimientos quirúrgicos es deseable una semivida corta y controlable, por ejemplo, que requiere una inhibición de agregación mediada por plaquetas durante un periodo de tiempo limitado. Además, cuando se producen problemas hemorrágicos u otras complicaciones, la dosificación puede reducirse inmediatamente. Los polipéptidos de la presente invención también conservan la actividad de unión a un pH y temperatura fuera de los intervalos fisiológicos habituales, lo que significa que pueden ser útiles en situaciones de pH y temperatura extremos que requieren una modulación de la agregación mediada por plaquetas, tal como en cirugía gástrica, control de hemorragia gástrica, ensayos realizados a temperatura ambiente etc. Los polipéptidos de la presente invención también presentan una estabilidad prolongada a extremos de pH, lo que significa que serían adecuados para el suministro mediante administración oral. Los polipéptidos de la presente invención pueden producirse de manera rentable a través de fermentación en organismos huésped recombinantes convenientes tales como *Escherichia coli* y levadura; al contrario que los anticuerpos convencionales que también requieren costosas instalaciones para el cultivo de células de mamífero, los niveles alcanzables de expresión son altos. Ejemplos de rendimientos de los polipéptidos de la presente invención son de 1 a 10 mg/ml (*E. coli*) y hasta 1 g/l (levadura). Los polipéptidos de la presente invención también presentan alta afinidad de unión por un amplio intervalo de diferentes tipos de antígeno, y capacidad para unirse a epítopos no reconocidos por anticuerpos convencionales; por ejemplo muestran largas estructuras de bucle basadas en CDR con el potencial de penetrar en las cavidades y presentan inhibición de la función enzimática. Además, puesto que la unión se produce a menudo únicamente a través del bucle de CDR3, se prevé que los péptidos derivados CDR3 pueden usarse terapéuticamente (Desmyter *et al.*, J Biol Chem, 2001, 276: 26285-90). Los polipéptidos de la invención también son capaces de conservar la capacidad de unión completa como proteína de fusión con una enzima o toxina. Además, puede esperarse que la trombocitopenia no deseable provocada por la activación mediada por el receptor Fc:Fc de la agregación plaquetaria y/o reticulación de plaquetas mediada por F(ab')(2) que se ha observado cuando se usa IgG o F(ab')(2) intactos terapéuticamente *in vivo* (véase Cauwenberghs N. *et al*, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular biology, 2000, 20: 1347), se evitará en el uso de  $V_{HH}$ , puesto que  $V_{HH}$  no contiene Fc y no es bivalente. Por tanto, los polipéptidos de la invención, homólogos o porciones funcionales de los mismos proporcionan un ahorro considerable de costes y tiempo en el tratamiento y el diagnóstico de estados relacionados con agregación mediada por plaquetas, y el paciente que necesita dichos polipéptidos se enfrentaría a menos problemas asociados con agentes convencionales.

La agregación mediada por plaquetas es el procedimiento en el que colágeno unido a vWF se adhiere a plaquetas y/o receptores de plaquetas, dando como resultado en última instancia a activación de plaquetas. La activación de plaquetas conduce a unión de fibrinógeno, y finalmente a agregación plaquetaria. Está dentro del alcance de la presente invención proporcionar polipéptidos que modulan los procedimientos que comprenden agregación mediada

por plaquetas tales como unión de colágeno a vWF, adhesión de receptor de plaquetas a vWF, adhesión de receptor de plaquetas a colágeno, activación de plaquetas, unión de fibrinógeno y/o agregación plaquetaria.

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

Según un aspecto de la invención, un Nanobody de la invención usado para formar un polipéptido de la invención puede ser un Nanobody completo de la invención (por ejemplo un  $V_{HH}$ ) o una secuencia homóloga del mismo. Según otro aspecto de la invención, un Nanobody de la invención usado para formar el polipéptido de la invención puede ser una porción funcional de un Nanobody completo de la invención. Según otro aspecto de la invención, un Nanobody de la invención usado para formar el polipéptido de la invención puede ser una secuencia homóloga de un Nanobody completo de la invención. Según otro aspecto de la invención, un Nanobody de la invención usado para formar el polipéptido de la invención puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un Nanobody completo de la invención.

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

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

Una secuencia homóloga según la presente invención incluye polipéptidos extendidos mediante la adición de aminoácidos para formar anticuerpo de cadena pesada humano o anticuerpo de cadena pesada de un solo dominio humano, que no alteran sustancialmente las características funcionales del polipéptido no modificado.

Cuando la secuencia homóloga indica identidad de secuencia, significa una secuencia que presenta una alta identidad de secuencia (más del 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 98 % de identidad de secuencia) con la secuencia original, y se caracteriza preferiblemente por propiedades similares de la secuencia original, concretamente afinidad, dicha identidad calculada usando métodos conocidos.

Alternativamente, una secuencia homóloga también puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que resulta de sustituciones permitidas en cualquier número de posiciones de la secuencia original según la fórmula a continuación:

Ser sustituida por Ser, Thr, Gly y Asn;

Arg sustituida por una de Arg, His, Gln, Lys y Glu;

Leu sustituida por una de Leu, Ile, Phe, Tyr, Met y Val;

Pro sustituida por una de Pro, Gly, Ala y Thr;

Thr sustituida por una de Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His y Gln;

Ala sustituida por una de Ala, Gly, Thr y Pro;

Val sustituida por una de Val, Met, Tyr, Phe, Ile y Leu;

Gly sustituida por una de Gly, Ala, Thr, Pro y Ser;

Ile sustituida por una de Ile, Met, Tyr, Phe, Val y Leu;

Phe sustituida por una de Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val y Leu;

Tyr sustituida por una de Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val y Leu;

His sustituida por una de His, Glu, Lys, Gln, Thr y Arg;

Gln sustituida por una de Gln, Glu, Lys, Asn, His, Thr y Arg;

5 Asn sustituida por una de Asn, Glu, Asp, Gln y Ser;

Lys sustituida por una de Lys, Glu, Gln, His y Arg;

Asp sustituido por uno de Asp, Glu y Asn;

10 Glu sustituido por uno de Glu, Asp, Lys, Asn, Gln, His y Arg;

Met sustituida por una de Met, Phe, Ile, Val, Leu y Tyr.

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

20 Tal como se usa en el presente documento, una porción funcional se refiere a un Nanobody de la invención de longitud suficiente de modo que la interacción de interés se mantiene con una afinidad de  $1 \times 10^{-6}$  M o mejor.

25 Alternativamente, una porción funcional de un Nanobody de la invención comprende una delección parcial de la secuencia completa de aminoácidos y todavía mantiene el/los sitio(s) de unión y el/los dominio(s) de proteínas necesario(s) para la unión de y la interacción con la diana.

30 Alternativamente, una porción funcional de cualquier Nanobody de la invención es un polipéptido que comprende una delección parcial de la secuencia completa de aminoácidos y que todavía mantiene el/los sitio(s) de unión y el/los dominio(s) de proteínas necesario(s) para la inhibición de unión de vWF a colágeno.

35 Alternativamente, una porción funcional de cualquier Nanobody de la invención es un polipéptido que comprende una delección parcial de la secuencia completa de aminoácidos y que todavía mantiene el/los sitio(s) de unión y el/los dominio(s) de proteínas necesario(s) para la unión de y la interacción con el dominio A1 de vWF.

40 Alternativamente, una porción funcional de cualquier Nanobody de la invención es un polipéptido que comprende una delección parcial de la secuencia completa de aminoácidos y que todavía mantiene el/los sitio(s) de unión y el/los dominio(s) de proteínas necesario(s) para la unión de y la interacción con el antígeno contra el cual se produjo. Incluye, pero no se limita a dominios  $V_{HH}$ .

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

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

50 Un aspecto de la presente invención es que la administración de un polipéptido de la invención según la invención puede evitar la necesidad de inyección. Las opciones terapéuticas convencionales basadas en anticuerpos tienen un potencial significativo como fármacos, puesto que tienen una especificidad exquisita a su diana y una toxicidad inherente baja, sin embargo, tienen una desventaja importante: son relativamente inestables, y son sensibles a degradación mediante proteasas. Esto significa que no pueden administrarse fármacos de anticuerpos convencionales por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación porque no son resistentes al pH bajo en estos sitios, la acción de proteasas en estos sitios y en la sangre y/o debido a su gran tamaño. Han de administrarse mediante inyección (por vía intravenosa, por vía subcutánea, etc.) para superar algunos de estos problemas. La administración mediante inyección requiere formación especializada con el fin de usar una jeringa o jeringuilla hipodérmica de manera correcta y segura. Se requieren además equipos estériles, una formulación líquida del polipéptido terapéutico, acondicionamiento de vial de dicho polipéptido en una forma estéril y estable y, del sujeto, un sitio adecuado para la entrada de la jeringuilla. Además, los sujetos experimentan comúnmente estrés físico y psicológico antes y después de recibir una inyección.

55 Un aspecto de la presente invención supera estos problemas de la técnica anterior, proporcionando los constructos de polipéptidos de la presente invención. Dichos constructos son lo suficientemente pequeños, resistentes y estables

65 Un aspecto de la presente invención supera estos problemas de la técnica anterior, proporcionando los constructos de polipéptidos de la presente invención. Dichos constructos son lo suficientemente pequeños, resistentes y estables



para administrarse por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación sustancial sin pérdida de actividad. Los constructos de polipéptidos de la presente invención evitan la necesidad de inyecciones, no solo ahorran en costes/tiempo, sino que también son más convenientes y más cómodos para el sujeto.

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

Tal como conocen los expertos en la técnica, una vez en posesión de dicho polipéptido de la invención, puede aplicarse tecnología de formulación para liberar una cantidad máxima de polipéptido en la ubicación correcta (en el estómago, en el colon, etc.). Este método de administración es importante para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos cuyas dianas se ubican en el sistema intestinal.

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno susceptible a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través del entorno gástrico sin inactivarse, mediante administración por vía oral a un sujeto de un polipéptido de la invención.

Otra realización de la presente invención es un uso de un Nanobody o polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través del entorno gástrico sin inactivarse.

Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al sistema intestinal sin inactivarse dicha sustancia, mediante administración por vía oral a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al torrente circulatorio de un sujeto sin que se inactive la sustancia, mediante administración por vía oral a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

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

En un ejemplo no limitativo, una formulación según la invención comprende un Nanobody o polipéptido de la invención, en forma de un gel, una crema, un supositorio, una película, o en forma de una esponja o como anillo vaginal que libera lentamente el principio activo a lo largo del tiempo (tales formulaciones se describen en los documentos EP 707473, EP 684814, US 5629001).

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada al tracto vaginal y/o rectal, mediante administración por vía vaginal y/o por vía rectal a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

Otra realización de la presente invención es un uso de un Nanobody o polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada al tracto vaginal y/o rectal.

Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al tracto vaginal y/o rectal sin inactivarse dicha sustancia, mediante administración al tracto vaginal y/o rectal a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al torrente circulatorio de un sujeto sin inactivarse dicha sustancia, mediante administración al tracto vaginal y/o rectal a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

Otra realización de la presente invención es un Nanobody o polipéptido de la invención, para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la nariz, las vías respiratorias altas y/o al pulmón.

En un ejemplo no limitativo, una formulación según la invención, comprende un Nanobody o polipéptido de la invención en forma de un pulverizador nasal (por ejemplo, un aerosol) o inhalador. Puesto que el Nanobody o

polipéptido de la invención es pequeño, puede alcanzar su diana de manera mucho más eficaz que moléculas de IgG terapéuticas.

5 Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a las vías respiratorias altas y al pulmón, mediante administración a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención, mediante inhalación a través de la boca o la nariz.

10 Otra realización de la presente invención es un uso de un Nanobody o polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la nariz, las vías respiratorias altas y/o al pulmón, sin inactivarse dicho polipéptido.

15 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la nariz, las vías respiratorias altas y al pulmón sin inactivación, mediante administración a la nariz, las vías respiratorias altas y/o al pulmón de un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

20 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al torrente circulatorio de un sujeto sin inactivación mediante administración a la nariz, las vías respiratorias altas y/o al pulmón de un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

25 Una realización de la presente invención es un Nanobody o polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal. Debido a su pequeño tamaño, un Nanobody o polipéptido de la invención puede pasar a través de la mucosa intestinal y alcanzar el torrente circulatorio de manera más eficaz en sujetos que padecen trastornos que provocan un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal.

30 Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal, mediante administración por vía oral a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

35 Este procedimiento puede potenciarse incluso adicionalmente mediante un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activo. En este aspecto de la invención,  $V_{HH}$  se condensa con un portador que potencia la transferencia a través de la pared intestinal al interior del torrente circulatorio. En un ejemplo no limitativo, este "portador" es un segundo  $V_{HH}$  que se condensa con el  $V_{HH}$  terapéutico. Tales constructos de fusión se elaboran usando métodos conocidos en la técnica. El "portador"  $V_{HH}$  se une específicamente a un receptor en la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

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

45 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la mucosa intestinal sin inactivarse, mediante administración por vía oral a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

50 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al torrente circulatorio de un sujeto sin inactivarse, mediante administración por vía oral a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

55 Este procedimiento puede incluso potenciarse adicionalmente mediante un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activo. En este aspecto de la invención, un Nanobody o polipéptido de la invención tal como se describe en el presente documento se condensa con un portador que potencia la transferencia a través de la pared intestinal al interior del torrente circulatorio. En un ejemplo no limitativo, este "portador" es un  $V_{HH}$  que se condensa con dicho polipéptido. Tales constructos de fusión se elaboran usando métodos conocidos en la técnica. El "portador"  $V_{HH}$  se une específicamente a un receptor en la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

60 Una realización de la presente invención es un Nanobody o polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través de los tejidos debajo de la lengua de manera eficaz. Una formulación de dicho Nanobody o polipéptido de la invención, por ejemplo, un

comprimido, pulverizador, gota se coloca debajo de la lengua y se adsorbe a través de las membranas mucosas en la red de capilares debajo de la lengua.

5 Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través de los tejidos debajo de la lengua de manera eficaz, mediante administración por vía sublingual a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

10 Otra realización de la presente invención es un uso de un Nanobody o polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través de los tejidos por debajo de la lengua.

15 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a los tejidos debajo de la lengua sin inactivarse, mediante administración por vía sublingual a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

20 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al torrente circulatorio de un sujeto sin inactivarse, mediante administración por vía oral a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

25 Una realización de la presente invención es un Nanobody o polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través de la piel de manera eficaz.

Se coloca una formulación de dicho Nanobody o polipéptido de la invención, por ejemplo, una crema, película, pulverizador, gota, parche, sobre la piel y pasa a través.

30 Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través de la piel de manera eficaz, mediante administración por vía tópica a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

35 Otra realización de la presente invención es un uso de un Nanobody o polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación mediante una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas que es capaz de pasar a través de la piel de manera eficaz.

40 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas a la piel sin inactivarse, mediante administración por vía tópica a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

45 Un aspecto de la invención es un método para administrar una sustancia que controla la agregación mediada por plaquetas al torrente circulatorio de un sujeto, mediante administración por vía tópica a un sujeto de un Nanobody o polipéptido de la invención.

50 En otra realización de la presente invención, un Nanobody o polipéptido de la invención comprende además un Nanobody portador de la invención (por ejemplo  $V_{HH}$ ) que actúa como portador de transporte activo para el transporte de dicho Nanobody o polipéptido de la invención por medio de la luz del pulmón a la sangre.

55 Un Nanobody o polipéptido de la invención que comprende además un portador que se une específicamente a un receptor presente sobre la superficie mucosa (células epiteliales bronquiales) que da como resultado el transporte activo del polipéptido desde la luz del pulmón hasta la sangre. El Nanobody portador de la invención puede condensarse con el Nanobody o polipéptido de la invención. Tales constructos de fusión se elaboran usando métodos conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. El Nanobody "portador" de la invención se une específicamente a un receptor sobre la superficie mucosa que induce una transferencia activa a través de la superficie.

60 Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar qué Nanobodies de la invención (por ejemplo  $V_{HH}$ ) se transportan de manera activa al torrente circulatorio tras administración nasal. De manera similar, una biblioteca de fagos de  $V_{HH}$  indiferenciada o inmunitaria puede administrarse por vía nasal, y tras diferentes momentos después de la administración, pueden aislarse sangre u órganos para rescatar fagos que se han transportado activamente al torrente circulatorio. Un ejemplo no limitativo de un receptor para el transporte activo desde la luz del pulmón hasta el torrente circulatorio es el receptor de Fc N (FcRn). Un aspecto de la invención incluye las moléculas de  $V_{HH}$  identificadas mediante el método. Tal  $V_{HH}$  puede usarse entonces como portador  $V_{HH}$

para la administración de un  $V_{HH}$  terapéutico a la diana correspondiente en el torrente circulatorio tras administración nasal.

Una realización de la presente invención es un Nanobody o polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos relacionados con agregación mediada por plaquetas o disfunción de las mismas. Dichos trastornos incluyen, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho estable o inestable, infarto cerebral, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis. Dichos trastornos incluyen además los que surgen de injerto de derivación coronaria, valvuloplastia de arterias coronarias e intervenciones coronarias tales como angioplastia, colocación de endoprótesis o aterectomía.

Otros trastornos son cualquiera de la formación de un trombo no oclusivo, la formación de un trombo oclusivo, formación de trombos arteriales, oclusión coronaria aguda, reestenosis, reestenosis tras PCTA o colocación de endoprótesis, formación de trombos en arterias estenosadas, hiperplasia tras angioplastia, aterectomía o colocación de endoprótesis arterial, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de arterias enfermas.

Un aspecto de la invención es un Nanobody o polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con agregación mediada por plaquetas o disfunción de las mismas, en el que dicho Nanobody o polipéptido de la invención se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

Otro aspecto de la invención es el uso de un Nanobody o polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con agregación mediada por plaquetas o disfunción de las mismas, en el que dicho Nanobody o polipéptido de la invención se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos o estados relacionados con agregación mediada por plaquetas o disfunción de las mismas, que comprende administrar a un sujeto un Nanobody o polipéptido de la invención, en el que dicho Nanobody o polipéptido heteroespecífico de la invención se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

Otro aspecto de la invención es un Nanobody o polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con agregación mediada por plaquetas o disfunción de las mismas.

Otro aspecto de la invención es un uso de un polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con agregación mediada por plaquetas o disfunción de las mismas.

Puede usarse un Nanobody o polipéptido de la invención de la presente invención con el fin de examinar agentes que modulan la unión del polipéptido a un vWF. Cuando se identifican en un ensayo que mide la unión o dicho desplazamiento de polipéptido solo, los agentes tendrán que someterse a pruebas funcionales para determinar si actúan como moduladores de la agregación mediada por plaquetas. Algunos ejemplos de métodos de examen adecuados se comentan en el documento WO 04/062551. Por supuesto, estos métodos pueden aplicarse fácilmente al examen para determinar candidatos moduladores que alteran la unión entre el Nanobody o polipéptido de la invención divulgado en el presente documento y vWF.

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

Una célula que es útil según la invención puede ser cualquier célula en la que puede o se ha introducido una secuencia de ácido nucleico que codifica un Nanobody o polipéptido de la invención de modo que el polipéptido se expresa a niveles naturales o por encima de niveles naturales, tal como se define en el presente documento. Preferiblemente un polipéptido de la invención que se expresa en una célula presenta farmacología normal o casi normal, tal como se define en el presente documento.

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

En general, "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" significa la cantidad necesaria para lograr el resultado o los resultados deseados (tratamiento o prevención de agregación

plaquetaria). Un experto habitual en la técnica reconocerá que la potencia y, por tanto, una “cantidad eficaz” puede variar para los diversos Nanobodies o polipéptidos que inhiben la agregación mediada por plaquetas usadas en la invención. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia del Nanobody o polipéptido.

5 Por “farmacéuticamente aceptable” quiere decirse un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el Nanobody o polipéptido sin provocar ningún efecto biológico no deseable o interactuar de manera perjudicial con ninguno de los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

10 La invención divulgada en el presente documento es útil para tratar o prevenir un estado de agregación mediada por plaquetas, en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un Nanobody o polipéptido o composición que inhibe BTK y que inhibe la agregación mediada por plaquetas.

15 La invención divulgada en el presente documento es útil para tratar o prevenir las primeras etapas de formación de trombos, en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un Nanobody o polipéptido o composición según la invención.

20 La invención divulgada en el presente documento es útil para tratar o prevenir reestenosis, en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un Nanobody o polipéptido o composición según la invención.

25 Un aspecto de la presente invención es el uso de Nanobodies o polipéptidos de la invención para tratar o prevenir un estado de agregación mediada por plaquetas, en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un Nanobody o polipéptido en combinación con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

30 Un aspecto de la presente invención es el uso de Nanobodies o polipéptidos de la invención para tratar o prevenir un estado de agregación mediada por plaquetas, en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un Nanobody o polipéptido en combinación con otro, tal como, por ejemplo, un agente trombolítico.

35 Otro aspecto de la presente invención es un uso de un Nanobody o polipéptido de la invención para tratar o prevenir placa o trombo en un individuo. Dicha formación de placas o trombos puede estar en condiciones de alta cizalladura. Tanto en trombosis como en reoclusión, la adhesión o anclaje reversible de las plaquetas a alta velocidad de cizalladura es seguido por una adhesión firme a través del receptor de colágeno sobre plaquetas que da como resultado activación de plaquetas; el anclaje de plaquetas mediante vWF a colágeno expuesto en la pared del vaso dañado es especialmente importante en condiciones de alta cizalladura. Los inventores han encontrado que el Nanobody o polipéptido de la invención de la presente invención rindió bien inesperadamente en condiciones de alta cizalladura.

40 La presente invención no se limita a la administración de formulaciones que comprenden un solo Nanobody o polipéptido de la invención. Está dentro del alcance de la invención proporcionar tratamientos de combinación en los que se administra una formulación a un paciente que lo necesita que comprende más de un Nanobody o polipéptido de la invención.

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

55 Se conoce bien en la técnica cómo determinar la inhibición de agregación mediada por plaquetas usando las pruebas convencionales descritas en el presente documento, o usando otras pruebas similares. Preferiblemente, el método daría como resultado al menos una reducción del 10 % en la agregación mediada por plaquetas, incluyendo, por ejemplo, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 100 %, o cualquier cantidad entremedias, más preferiblemente en el 90 %.

60 De manera similar, el método daría como resultado al menos una reducción del 10 % en movilización de calcio intracelular incluyendo, por ejemplo, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 100 %. De manera similar, el método daría como resultado al menos una reducción del 10 % en el nivel de PLCg 2 fosforilado incluyendo, por ejemplo, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 100 %.

La reducción puede medirse, por ejemplo, comparando la impedancia óptica en un agregómetro plaquetario Chronolog. También puede usarse cualquier otro método de medición conocido. Por ejemplo, (1) tras la estimulación con colágeno, el nivel de movilización de calcio intracelular inducida por colágeno aumenta a lo largo del tiempo y de ese modo la medición puede incluir medir el nivel de calcio intracelular inducido por colágeno o (2) tras la estimulación con colágeno, el nivel de PLCg 2 fosforilado aumenta a lo largo del tiempo y de ese modo la medición puede incluir medir el nivel de PLCg 2 fosforilado.

Las células pueden ponerse en contacto *in vitro*, por ejemplo, añadiendo un Nanobody o polipéptido de la invención al medio de cultivo (mediante infusión continua, mediante administración de bolo, o cambiando el medio a un medio que contiene el Nanobody o polipéptido) o añadiendo el Nanobody o polipéptido al fluido extracelular *in vivo* (mediante administración local, administración sistémica, inhalación, inyección intravenosa, administración de bolo, o infusión continua). La duración de "contacto" con una célula o población de células se determina mediante el tiempo que el Nanobody o polipéptido está presente a niveles fisiológicamente eficaces o a presuntos niveles fisiológicamente eficaces en el medio o fluido extracelular que baña la célula o las células. Preferiblemente, la duración de contacto es de 1-96 horas, y más preferiblemente, durante 24 horas, pero un tiempo de este tipo variaría basándose en la semivida del Nanobody o polipéptido y podría optimizarse por un experto en la técnica usando experimentación de rutina.

El Nanobody o polipéptido útil en la presente invención puede formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano o un animal doméstico en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida, es decir, por vía oral o por vía parenteral, mediante inhalación por vía intranasal, vías intravenosas, intramusculares, tópicas o subcutáneas.

El Nanobody o polipéptido de la presente invención también puede administrarse usando métodos de administración de terapia génica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.399.346. Usando un método de administración de terapia génica, células primarias transfectadas con el gen para el Nanobody o polipéptido de la presente invención pueden transfectarse adicionalmente con promotores específicos de tejido a órganos, tejido, injertos, tumores o células específicos de diana.

Por tanto, el presente Nanobody o polipéptido puede administrarse por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina dura o blanda, pueden comprimirse para dar comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, el Nanobody o polipéptido puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos para chupar, pastillas para chupar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1 % del Nanobody o polipéptido. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar de manera conveniente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60 % del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad del Nanobody o polipéptido en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas, y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; pueden añadirse excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similar; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa, aspartamo o un agente aromatizante tal como menta piperita, aceite de gaulteria, o aroma a cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Pueden presentarse otros diversos materiales como recubrimientos o para de otro modo modificar la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, pueden recubrirse comprimidos, pastillas, o cápsulas con gelatina, cerca, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el Nanobody o polipéptido, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente atóxico en las cantidades empleadas. Además, el Nanobody o polipéptido puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El Nanobody o polipéptido también puede administrarse por vía intravenosa o por vía intraperitoneal mediante infusión o inyección. Pueden prepararse disoluciones del Nanobody o polipéptido en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo atóxico. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que se adaptan para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, opcionalmente

encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación definitiva debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres glicerílicos atóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

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

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

Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxialquitos o glicoles o combinaciones de agua-alcohol/glicerol, en las que el presente Nanobody o polipéptido puede disolverse o dispersarse a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos atóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de compresas absorbentes, usadas para impregnar vendajes y otros apósitos, o pulverizarse sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol.

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

En la técnica se conocen ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden usarse para administrar el Nanobody o polipéptido a la piel; por ejemplo, véase Jacquet *et al.* (patente estadounidense n.º 4.608.392), Geria (patente estadounidense n.º 4.992.478), Smith *et al.* (patente estadounidense n.º 4.559.157) y Wortzman (patente estadounidense n.º 4.820.508).

Pueden determinarse dosificaciones útiles del Nanobody o polipéptido comparando su actividad *in vitro*, y actividad *in vivo* en modelos de animales. En la técnica se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones, y otros animales, a humanos; por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 4.938.949.

Generalmente, la concentración del Nanobody o polipéptido en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-10 % en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-2,5 % en peso.

La cantidad del Nanobody o polipéptido requerida para su uso en tratamiento variará con la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose y la edad y el estado del paciente y será en última estancia a juicio del médico o facultativo asociado. Además, la dosificación del Nanobody o polipéptido varía según la célula, el tumor, el tejido, el injerto o el órgano diana.

La dosis deseada puede presentarse de manera conveniente en una única dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La subdosis en sí puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones diferenciadas ligeramente espaciadas; tal como múltiples inhalaciones de un insuflador o mediante aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

Un régimen de administración podría incluir tratamiento diario de larga duración. Por “de larga duración” quiere decirse al menos dos semanas y preferiblemente, varias semanas, meses o años de duración. Un experto habitual en la técnica puede determinar modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación usando únicamente experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ajustarse por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

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

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

Pueden examinarse agentes moduladores candidatos de grandes bibliotecas de agentes sintéticos o naturales. Actualmente se usan numerosos medios para síntesis aleatoria y dirigida de agentes a base de sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos. Las bibliotecas de agentes sintéticos están comercialmente disponibles de varias empresas incluyendo Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, R.U.), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), y Microsource (New Milford, CT). Una biblioteca química rara está disponible de Aldrich (Milwaukee, WI). Están disponibles y pueden prepararse bibliotecas de combinación. Alternativamente, están disponibles bibliotecas de agentes naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales de, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o son fácilmente producibles mediante métodos bien conocidos en la técnica. Además, bibliotecas y agentes producidos de manera natural y sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

Pueden encontrarse agentes útiles dentro de numerosas clases químicas. Agentes útiles pueden ser agentes orgánicos, o agentes orgánicos pequeños. Los agentes orgánicos pequeños tienen un peso molecular de más de 50 aunque menos de aproximadamente 2500 Dalton, preferiblemente menos de aproximadamente 750, más preferiblemente menos de aproximadamente 350 Dalton. Las clases a modo de ejemplo incluyen heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides, y similares. Los agentes pueden modificarse para potenciar la eficacia, estabilidad, compatibilidad farmacéutica, y similares. La identificación estructural de un agente puede usarse para identificar, generar o examinar agentes adicionales. Por ejemplo, cuando se identifican agentes peptídicos, pueden modificarse en una variedad de formas para potenciar su estabilidad, tal como usando un aminoácido no natural, tal como un D-aminoácido, particularmente D-alanina, funcionalizando los extremos amino o carboxílico, por ejemplo para el grupo amino, acilación o alquilación, y para el grupo carboxilo, esterificación o amidificación, o similar.

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

Un kit de examen de alto rendimiento según la invención comprende todos los medios y recursos necesarios para realizar la detección de un agente que modula agregación mediada por plaquetas interaccionando con una diana de la invención, tal como por ejemplo vWF, o fragmento del mismo en presencia de un polipéptido, preferiblemente a una concentración en el intervalo de 1  $\mu$ M a 1 mM. El kit comprende lo siguiente. Células recombinantes de la invención, que comprenden y expresan la secuencia de nucleótidos que codifica vWF, o fragmento del mismo, que se hacen crecer según el kit sobre un soporte sólido, tal como una placa de microtitulación, más preferiblemente una placa de microtitulación de 96 pocillos, según métodos bien conocidos por el experto en la técnica especialmente tal como se describe en el documento WO 00/02045. Alternativamente, el experto en la técnica suministra vWF, o fragmento del mismo, en una forma purificada para inmovilizarse sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos. Alternativamente, se suministra vWF, o fragmento del mismo, en el kit preinmovilizado sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añaden agentes moduladores según la invención, a concentraciones de desde aproximadamente 1  $\mu$ M hasta 1 mM o más, a pocillos definidos en presencia de una concentración apropiada de Nanobody o polipéptido de la invención, dicha concentración de dicho polipéptido preferiblemente en el intervalo de 1  $\mu$ M a 1 mM. Los kits pueden contener más de un polipéptido.

Se realizan ensayos de unión según los métodos ya divulgados en el presente documento y los resultados se comparan con el nivel inicial de, por ejemplo vWF, o fragmento del mismo que se une a un polipéptido de la invención, pero en ausencia de agente modulador añadido. Los pocillos que muestran al menos 2 veces, preferiblemente 5 veces, más preferiblemente 10 veces y lo más preferiblemente a 100 veces o más de aumento o disminución en la unión vWF-polipéptido (por ejemplo) en comparación con el nivel de actividad en ausencia de modulador, se seleccionan para su análisis adicional.

La invención proporciona kits útiles para examinar moduladores de la agregación mediada por plaquetas, así como kits útiles para el diagnóstico de enfermedades o trastornos caracterizados por desregulación de la agregación mediada por plaquetas. Los kits útiles según la invención pueden incluir un vWF aislado, o fragmento del mismo. Alternativamente, o además, un kit puede comprender células transformadas para expresar vWF, o fragmento del mismo. En una realización adicional, un kit según la invención puede comprender un polinucleótido que codifica vWF, o fragmento del mismo. En una realización todavía adicional, un kit según la invención puede comprender los cebadores específicos útiles para la amplificación de vWF, o fragmento del mismo. Los kits útiles según la invención pueden comprender un Nanobody o polipéptido de la invención. Un kit según la invención puede comprender células



transformadas para expresar dicho polipéptido. Los kits pueden contener más de un polipéptido. En una realización adicional, un kit según la invención puede comprender un polinucleótido que codifica una macromolécula, por ejemplo, vWF, o fragmento del mismo. En una realización todavía adicional, un kit según la invención puede comprender los cebadores específicos útiles para la amplificación de una macromolécula tal como, por ejemplo, vWF, o fragmento del mismo. Todos los kits según la invención comprenderán los puntos establecidos o combinaciones de puntos y materiales de envasado por tanto. Los kits también incluirán instrucciones para su uso.

La invención también proporciona dispositivos médicos invasivos recubiertos con un Nanobody o polipéptido de la invención o un agente que resulta de un método de examen de la invención para su uso en dispositivos que requieren lo mismo. Los ejemplos no limitativos de dispositivos incluyen tubos quirúrgicos, dispositivos de oclusión, dispositivos protésicos. La aplicación de dichos dispositivos incluye procedimientos quirúrgicos que requieren una modulación de la agregación mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión.

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

Otra realización de la presente son dispositivos médicos invasivos que sortean la agregación mediada por plaquetas alrededor del sitio de invasión, en el que dicho dispositivo está recubierto con un Nanobody o polipéptido de la invención o agente según la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos un trastorno mediado por agregación (tal como se describe en el presente documento), comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

En el contexto de la presente invención, el término "prevención y/o tratamiento" no solo comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, sino que también comprende generalmente prevenir la aparición de la enfermedad, ralentizar o revertir el progreso de la enfermedad, prevenir o ralentizar la aparición de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir y/o aliviar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir la gravedad y/o la duración de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma y/o prevenir un aumento adicional de la gravedad de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma, prevenir, reducir o revertir cualquier daño fisiológico provocado por la enfermedad, y generalmente cualquier acción farmacológica que sea beneficiosa para el paciente que está tratándose.

El sujeto que va a tratarse puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más en particular un ser humano. Tal como quedará claro para el experto, el sujeto que va a tratarse será en particular una persona que padece, o corre el riesgo de, las enfermedades y los trastornos mencionados en el presente documento.

La invención también se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede prevenirse y/o tratarse administrando un Nanobody o polipéptido de la invención a un paciente, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

Más en particular, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno elegido del grupo que consiste en las enfermedades y trastornos enumerados en el presente documento, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

En otra realización, la invención se refiere a un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, método que comprende administrar, a un sujeto que padece o corre el riesgo de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

En los métodos anteriores, los Nanobodies y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos pueden administrarse de cualquier manera adecuada, dependiendo de la composición o formulación farmacéutica específica que va a usarse. Por tanto, los Nanobodies y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos pueden administrarse por ejemplo por vía oral, por vía intraperitoneal (por ejemplo por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular o por medio de cualquier otra vía de administración que sortee el tracto gastrointestinal), por vía intranasal, por vía transdérmica, por vía tópica, por medio de un supositorio, mediante inhalación, dependiendo de nuevo de la composición o formulación farmacéutica específica que va a usarse. El médico podrá seleccionar una vía de administración adecuada y una composición o formulación farmacéutica adecuada que va a usarse en tal administración, dependiendo de la enfermedad o

trastorno que va a prevenirse o tratarse y otros factores bien conocidos para el médico.

Tal como se menciona en el presente documento y tal como quedará claro para el experto, para estados y complicaciones agudas (es decir, tal como pueden producirse con algunos de los trastornos mediados por agregación mencionados en el presente documento), habitualmente se preferirá la administración directamente en el torrente circulatorio mediante infusión o inyección o cualquier otro medio adecuado.

Los Nanobodies y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos se administran según un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno que va a prevenirse o tratarse. El médico será capaz generalmente de determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o trastorno que va a prevenirse o tratarse, la gravedad de la enfermedad que va a tratarse y/o la gravedad de los síntomas de la misma, el Nanobody o polipéptido específico de la invención que va a usarse, la vía específica de administración y la composición o formulación farmacéutica que va a usarse, la edad, el género, el peso, la dieta, el estado general del paciente y factores similares bien conocidos por el médico.

Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de uno o más Nanobodies y/o polipéptidos de la invención, o de una o más composiciones que comprenden los mismos, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente eficaces. La(s) cantidad(es) o dosis específica(s) que va(n) a administrarse puede determinarlas el médico, de nuevo basándose en los factores citados anteriormente.

Generalmente, para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento y dependiendo la enfermedad o trastorno específico que va a tratarse, la potencia del Nanobody y polipéptido específicos de la invención que va a usarse, la vía específica de administración y la composición o formulación farmacéutica específica usada, los Nanobodies y polipéptidos de la invención se administrarán generalmente en una cantidad de entre 1 gramo y 0,01 microgramos por kg de peso corporal al día, preferiblemente entre 0,1 gramos y 0,1 microgramos por kg de peso corporal al día, tal como aproximadamente 1, 10, 100 o 1000 microgramos por kg de peso corporal al día, o bien de manera continua (por ejemplo mediante infusión), como una única dosis diaria o bien como múltiples dosis divididas durante el día. El médico podrá generalmente determinar una dosis diaria adecuada, dependiendo de los factores mencionados en el presente documento. También quedará claro que, en casos específicos, el médico puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo basándose en los factores citados anteriormente y su criterio experto. Generalmente, puede obtenerse algo de orientación sobre las cantidades que van a administrarse a partir de las cantidades habitualmente administradas para anticuerpos convencionales o fragmentos de anticuerpo comparables contra la misma diana administrados por medio de esencialmente la misma vía, teniendo en cuenta, sin embargo, diferencias de afinidad/avidez, eficacia, biodistribución, semivida y factores similares bien conocidos por el experto.

Habitualmente, en el método anterior, se usará un solo Nanobody o polipéptido de la invención. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención usar dos o más Nanobodies y/o polipéptidos de la invención en combinación.

Los Nanobodies y polipéptidos de la invención pueden usarse también en combinación con uno o más principios o compuestos farmacéuticamente activos adicionales, es decir como un régimen de tratamiento combinado, lo que puede conducir o no a un efecto sinérgico. De nuevo, el médico podrá seleccionar compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basándose en los factores citados anteriormente y su criterio experto.

En particular, los Nanobodies y polipéptidos de la invención pueden usarse en combinación con otros principios o compuestos farmacéuticamente activos que se usan o pueden usarse la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y trastornos citados en el presente documento, como resultado de lo cual puede obtenerse o no un efecto sinérgico. Los ejemplos de tales compuestos y principios, así como vías, métodos y formulaciones o composiciones farmacéuticas para administrarlos quedarán claros para el médico, y por ejemplo incluyen, pero no se limitan a heparina, aspirina (por ejemplo Aspebic®), Plavix y/o Reopro.

Cuando dos o más sustancias o principios van a usarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, pueden administrarse por medio de la misma vía de administración o por medio de diferentes vías de administración, a esencialmente el mismo tiempo o a tiempos diferentes (por ejemplo esencialmente de manera simultánea, consecutiva, o según un régimen alternante). Cuando las sustancias o principios van a administrarse simultáneamente por medio de la misma vía de administración, pueden administrarse como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o parte de una composición o formulación farmacéutica combinada, tal como quedará claro para el experto.

Además, cuando dos o más sustancias o principios activos van a usarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios pueden administrarse en la misma cantidad y según el mismo régimen que se usó cuando el compuesto o principio se usa por sí mismo, y tal uso combinado puede conducir o no a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de las dos o más sustancias o principios activos conducen a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de una, más o todas las sustancias o

principios que van a administrarse, al tiempo que todavía se logra la acción terapéutica deseada. Esto puede ser por ejemplo útil para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario no deseado que esté asociado con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades habituales, al tiempo que todavía se obtiene el efecto terapéutico o farmacéutico deseado.

La eficacia del régimen de tratamiento usado según la invención puede determinarse y/o seguirse de cualquier manera conocida *per se* para la enfermedad o trastorno implicado, tal como quedará claro para el médico. El médico también podrá, cuando sea apropiado y o en una base caso a caso, cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir efectos secundarios no deseados, y/o para lograr un equilibrio apropiado entre lograr el efecto terapéutico deseado por un lado y evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados por el otro.

El sujeto que va a tratarse puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más en particular un ser humano. Tal como quedará claro para el experto, el sujeto que va a tratarse será en particular una persona que padece, o corre el riesgo de, las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento.

La invención también se refiere al uso de un Nanobody o polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno (por ejemplo un trastorno de la agregación tal como se mencionó en el presente documento) que puede prevenirse y/o tratarse administrando un Nanobody o polipéptido de la invención a un paciente.

Generalmente, el régimen de tratamiento se seguirá hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o durante tanto tiempo como haya de mantenerse el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede determinarlo el médico.

Finalmente, también quedará claro para el experto que puede ser posible "injertar" una o más de las CDR mencionadas anteriormente para los Nanobodies de la invención sobre otros "armazones", incluyendo pero sin limitarse a armazones humanos o armazones distintos de inmunoglobulina. Los armazones y las técnicas adecuadas para tal injerto de CDR quedarán claros para el experto y se conocen bien en la técnica, véanse por ejemplo los documentos US-A-7,180,370, WO 01/27160, EP 0 605 522, EP 0 460 167, US-A-7.054.297, Nicaise *et al.*, Protein Science (2004), 13:1882-1891; Ewert *et al.*, Methods, octubre de 2004; 34(2):184-199; Kettleborough *et al.*, Protein Eng. Octubre de 1991; 4(7): 773-783; O'Brien y Jones, Methods Mol. Biol. 2003: 207: 81-100; y Skerra, J. Mol. Recognit. 2000: 13: 167-187, y Saerens *et al.*, J. Mol. Biol. 23 de septiembre de 2005; 352(3):597-607, y las referencias adicionales citadas en los mismos; y también incluyen por ejemplo las regiones de entramado de otros anticuerpos de (un solo) dominio. Por ejemplo, pueden usarse técnicas conocidas *per se* para injertar CDR de ratón o rata sobre armazones y regiones de entramado humanas de una manera análoga para proporcionar proteínas quiméricas que comprenden uno o más de los CDR de los Nanobodies de la invención y una o más secuencias o regiones de entramado humanas.

Por tanto, en otra realización, la descripción comprende un polipéptido quimérico que comprende al menos una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de CDR1, secuencias de CDR2 y secuencias de CDR3 mencionadas en el presente documento para los Nanobodies de la invención. Preferiblemente, un polipéptido quimérico de este tipo comprende al menos una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 mencionadas en el presente documento para los Nanobodies de la invención, y opcionalmente también al menos una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de secuencias de CDR1 y CDR2 mencionadas en el presente documento para los Nanobodies de la invención. Por ejemplo, un polipéptido quimérico de este tipo puede comprender una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 mencionadas en el presente documento para los Nanobodies de la invención, una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 mencionadas en el presente documento para los Nanobodies de la invención y una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de secuencias de CDR1 y CDR2 mencionadas en el presente documento para los Nanobodies de la invención. Las combinaciones de CDR que se mencionan en el presente documento como preferidas para los Nanobodies de la invención también se preferirán habitualmente para estos polipéptidos quiméricos.

En dichos polipéptidos quiméricos, las CDR pueden unirse a secuencias de aminoácidos adicionales y/o pueden unirse entre sí por medio de secuencias de aminoácidos, en los que dichas secuencias de aminoácidos son preferiblemente secuencias de región de entramado o son secuencias de aminoácidos que actúan como secuencias de región de entramado, o forman juntas un armazón para presentar las CDR. Se hace referencia de nuevo a la técnica anterior mencionada en el último párrafo. Según una realización preferida, las secuencias de aminoácidos son secuencias de región de entramado humanas, por ejemplo secuencias de región de entramado V<sub>H</sub>3. Sin embargo, también pueden usarse secuencias de región de entramado no humanas, sintéticas, semisintéticas o distintas de inmunoglobulina. Preferiblemente, las secuencias de región de entramado usadas son tales que (1) el polipéptido quimérico puede unirse a xxxx, es decir con una afinidad que es de al menos el 1 %, preferiblemente al menos el 5 %, más preferiblemente al menos el 10 %, tal como al menos el 25 % y hasta el 50 % o el 90 % o más de la afinidad del Nanobody correspondiente de la invención; (2) el polipéptido quimérico es adecuado para uso

farmacéutico; y (3) el polipéptido quimérico es preferiblemente no inmunogénico esencialmente en las condiciones previstas para uso farmacéutico (es decir indicación, modo de administración, dosis y régimen de tratamiento) del mismo (que pueden ser esencialmente análogas a las condiciones descritas en el presente documento para el uso de los Nanobodies de la invención).

Según una realización no limitativa, el polipéptido quimérico comprende al menos dos secuencias de CDR (tal como se mencionó anteriormente) unidas por medio de al menos una secuencia de región de entramado, en el que preferiblemente al menos una de las dos secuencias de CDR es una secuencia de CDR3, siendo la otra secuencia de CDR una secuencia de CDR1 o CDR2. Según una realización preferida, pero no limitativa, el polipéptido quimérico comprende al menos dos secuencias de CDR (tal como se mencionó anteriormente) unidas por al menos dos secuencias de región de entramado, en el que preferiblemente al menos una de las tres secuencias de CDR es una secuencia de CDR3, siendo las otras dos secuencias de CDR secuencias de CDR1 o CDR2, y siendo preferiblemente una secuencia de CDR1 y una secuencia de CDR2. Según una realización específicamente preferida, pero no limitativa, los polipéptidos quiméricos tienen la estructura FR1' - CDR1 - FR2' - CDR2 - FR3' - CDR3 - FR4', en la que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento para las CDR de los Nanobodies de la invención, y FR1', FR2', FR3' y FR4' son secuencias de región de entramado. FR1', FR2', FR3' y FR4' pueden ser en particular secuencias de región de entramado 1, región de entramado 2, región de entramado 3 y región de entramado 4, respectivamente, de un anticuerpo humano (tal como secuencias de V<sub>H</sub>3) y/o partes o fragmentos de tales secuencias de región de entramado. También es posible usar partes o fragmentos de un polipéptido quimérico con la estructura FR1' - CDR1 - FR2' - CDR2 - FR3' - CDR3 - FR4. Preferiblemente, tales partes o fragmentos son tales que cumplen los criterios expuestos en el párrafo anterior.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de las siguientes figuras y ejemplos no limitativos, en los que las figuras muestran:

Figura 1: Unión de nanobodies a vWF en ELISA

Figura 2: Alineación de secuencias de nanobodies homólogos a 12A5

Figura 3: Alineación de secuencias de nanobodies homólogos a 12B6

Figura 4: Unión de nanobodies homólogos a 12A5 a vWF en BIACORE

Figura 5: Unión de nanobodies homólogos a 12B6 a vWF en BIACORE

Figura 6: Adhesión plaquetaria a diferentes concentraciones de nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5

Figura 7a: Unión en ELISA a vWF para el nanobody 12B6 tras calentamiento a temperaturas crecientes

Figura 7b: Unión en ELISA a vWF para el nanobody 12A2 tras calentamiento a temperaturas crecientes

Figura 7c: Unión en ELISA a vWF para el nanobody 12A5 tras calentamiento a temperaturas crecientes

Figura 8a: Unión de vWF de diferentes especies al nanobody 12B6 en ELISA

Figura 8b: Unión de vWF de diferentes especies al nanobody 12A2 en ELISA

Figura 8c: Unión de vWF de diferentes especies al nanobody 12A5 en ELISA

Figura 9: Unión de nanobodies 12B6 bivalentes a vWF en BIACORE

Figura 10: Unión de nanobodies 12A2 bivalentes a vWF en BIACORE

Figura 11: Unión de nanobodies 12A5 bivalentes a vWF en BIACORE

Figura 12: Unión en ELISA a vWF de nanobodies 12B6 bivalentes tras calentamiento a temperaturas crecientes

Figura 13: Unión en ELISA a vWF de nanobodies 12A2 bivalentes tras calentamiento a temperaturas crecientes

Figura 14: Unión en ELISA a vWF de nanobodies 12A5 bivalentes tras calentamiento a temperaturas crecientes

Figura 15: Alineación de secuencias de nanobody 12B6 humanizado

Figura 16: Unión en ELISA a vWF de nanobody 12B6 de tipo natural y humanizado

Figura 17: Alineación de secuencias de nanobody 12A2 humanizado

- Figura 18: Unión en ELISA a vWF de nanobodies 12A2 humanizados, tras calentamiento a temperaturas crecientes
- Figura 19: Unión en ELISA a vWF de nanobodies 12A2 humanizados
- 5 Figura 20: Alineación de secuencias de nanobody 12A5 humanizado
- Figura 21: Unión en ELISA a vWF de nanobody 12A5 de tipo natural y humanizado
- 10 Figura 22: Alineación de nanobodies seleccionados para la forma bivalente
- Figura 23: Adhesión plaquetaria a diferentes concentraciones de nanobodies bivalentes (humanizados)
- Figura 24: Patrón de flujo de sangre para el modelo de Folts en babuinos
- 15 Figura 25: Configuración experimental para el modelo de Folts en babuinos
- Figura 26: Estudio de Folts del grupo de control de babuinos. Se muestra el flujo de sangre en función del tiempo, indicando las CFR (representativas de 2 experimentos independientes)
- 20 Figura 27: Estudio de Folts del grupo de babuinos tratados con Aspegic. Se muestra el flujo de sangre en función del tiempo, indicando las CFR (representativas de 3 experimentos independientes)
- Figura 28: Estudio del grupo de babuinos tratados con heparina. Se muestra el flujo de sangre en función del tiempo, indicando las CFR (representativas de 3 experimentos independientes)
- 25 Figura 29: Estudio de Folts del grupo de babuinos tratados con Plavix. Se muestra el flujo de sangre en función del tiempo, indicando las CFR (representativas de 4 experimentos independientes)
- Figura 30: Estudio de Folts del grupo de babuinos tratados con Reopro. Se muestra el flujo de sangre en función del tiempo, indicando las CFR (representativas de 3 experimentos independientes)
- 30 Figura 31: Estudio de Folts del grupo de babuinos tratados con ALX-0081 (SEQ ID NO: 98). Se muestra el flujo de sangre en función del tiempo, indicando las CFR (representativas de 8 experimentos independientes)
- 35 Figura 32: Lectura de flujo del babuino ID 6 tratado con una combinación de Aspegic, heparina, Plavix y ALX-0081
- Figura 33: Promedios de pérdida de sangre relativa en función de diferentes dosis de Plavix, Reopro y ALX-0081
- 40 Figura 34: Duración promedio de CFR y cantidad relativa promedio de pérdida de sangre para animales tratados con Plavix en función de una dosis de fármaco creciente.
- Figura 35: Duración promedio de CFR y cantidad relativa promedio de pérdida de sangre para animales tratados con Reopro en función de una dosis de fármaco creciente
- 45 Figura 36: Duración promedio de CFR y cantidad relativa promedio de pérdida de sangre para animales tratados con ALX-0081 en función de dosis de fármaco creciente
- Figura 37: Agregación inducida por ristocetina (% , ■) y duración de CFR (s, ♦) para cada babuino tratado con ALX-0081 en función de todas las dosis
- 50 Figura 38: Concentración de ALX-0081 en plasma frente a la duración de CFR para todos los babuinos tratados con ALX-0081
- Figura 39: Concentración de ALX-0081 en plasma frente a la cantidad relativa de pérdida de sangre a partir de las gasas
- 55 Figura 40: Estudio de Folts del babuino 1 tratado con ALX-0081 y vWF. Se muestra el flujo de sangre en función del tiempo, indicando las CFR
- 60 Figura 41: Cordones (flechas) de plaquetas adheridas sobre ULvWF secretado a partir de células endoteliales estimuladas
- Figura 42: Ausencia de cordones cuando las plaquetas se perfunden sobre ULvWF en presencia de ALX-0081
- 65 Figura 43: Experimento de perfusión de control: cordones de ULvWF antes (panel A, indicado con flechas rojas) y

durante (panel B) la perfusión con plasma normal. En el panel B, los cordones de ULvWF que se escinden por ADAMTS-13 se indican con una flecha azul y roja para un trozo de un cordón de ULvWF que está alejándose o para cordones de ULvWF escindidos en gran medida respectivamente

5 Figura 44: Experimento de perfusión en presencia de ALX-0081. Imagen microscópica de un campo antes (panel A) y del mismo campo después (panel B) de la perfusión con plasma normal. Se indica un cordón de ULvWF en el panel A con una flecha roja que está ausente en el panel B debido a la escisión del ULvWF por ADAMTS-13.

10 Figura 45: Escisión de A1-A2-A3 por ADAMTS-13 presente en plasma normal agrupado (NPP) en ausencia y presencia de ALX-0081

y en los que las tablas, que forman una parte integral de la presente descripción, son tal como sigue:

15 Tabla 8: Lista de secuencias de Nanobodies anti-vWF

Tabla 9: Rendimientos de expresión de Nanobodies anti-vWF

Tabla 10: Adhesión plaquetaria en cámara de perfusión de Nanobodies anti-vWF

20 Tabla 11: Lista de secuencias de los nanobodies homólogos a 12B6 y 12A5

Tabla 12: Valores de asociación, disociación y KD estimados para nanobodies homólogos a 12A5

Tabla 13: Valores de asociación, disociación y KD estimados para nanobodies homólogos a 12B6

25 Tabla 14: Valor de KD real de los nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5

Tabla 15: Adhesión plaquetaria en cámara de perfusión de nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5

30 Tabla 16: Concentración de nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5 tras calentamiento a temperaturas crecientes

Tabla 17: Lista de secuencias de nanobodies bivalentes

Tabla 18: Lista de secuencias de secuencias de ligador

35 Tabla 19: Rendimientos de expresión de nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5 bivalentes

Tabla 20: Concentración de nanobodies bivalentes 12B6 tras calentamiento a temperaturas crecientes

40 Tabla 21: Concentración de nanobodies bivalentes 12A2 tras calentamiento a temperaturas crecientes

Tabla 22: Concentración de nanobodies bivalentes 12A5 tras calentamiento a temperaturas crecientes

45 Tabla 23: Adhesión plaquetaria en cámara de perfusión de nanobodies bivalentes 12A2

Tabla 24: Lista de secuencias de nanobodies 12B6 humanizados

Tabla 25: Rendimientos de expresión de nanobodies 12B6 de tipo natural y humanizados

50 Tabla 26: Concentración de nanobodies 12B6 de tipo natural y humanizados tras calentamiento a temperaturas crecientes

Tabla 27: Valores de KD para nanobodies 12B6 de tipo natural y humanizados

55 Tabla 28: Lista de secuencias de nanobodies 12A2 humanizados

Tabla 29: Rendimientos de expresión de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados

60 Tabla 30: Concentración de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados tras calentamiento a temperaturas crecientes

Tabla 31: Adhesión plaquetaria de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados en cámara de perfusión a 0,7 y 1,5 ug/ml

65 Tabla 32: Adhesión plaquetaria de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados en cámara de perfusión a 0,5, 1 y 2 ug/ml

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Tabla 33: Valores de KD para nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados                                                                                                                                                                                                                                 |
| 5  | Tabla 34: Lista de secuencias de nanobodies 12A5 humanizados                                                                                                                                                                                                                                               |
|    | Tabla 35: Rendimientos de expresión de nanobodies 12A5 de tipo natural y humanizados                                                                                                                                                                                                                       |
| 10 | Tabla 36: Concentración de nanobodies 12A5 de tipo natural y humanizados tras calentamiento a temperaturas crecientes                                                                                                                                                                                      |
|    | Tabla 37: Valores de KD para nanobodies 12A5 de tipo natural y humanizados                                                                                                                                                                                                                                 |
|    | Tabla 38: Lista de secuencias de nanobodies bivalentes humanizados                                                                                                                                                                                                                                         |
| 15 | Tabla 39: Rendimientos de expresión de nanobodies bivalentes humanizados                                                                                                                                                                                                                                   |
|    | Tabla 40: Concentración de nanobody bivalente humanizado tras calentamiento a temperaturas crecientes                                                                                                                                                                                                      |
| 20 | Tabla 41: Adhesión plaquetaria de nanobodies bivalentes de tipo natural y humanizados                                                                                                                                                                                                                      |
|    | Tabla 42: Babuinos usados con los diferentes compuestos de prueba en el estudio de Folts                                                                                                                                                                                                                   |
|    | Tabla 43: Duración de CFR (s) para animales de control (ND= no realizado)                                                                                                                                                                                                                                  |
| 25 | Tabla 44: Duración de CFR para animales tratados con Aspegic™ (ND = no realizado)                                                                                                                                                                                                                          |
|    | Tabla 45: Duración de CFR para animales tratados con Heparin™ (ND = no realizado)                                                                                                                                                                                                                          |
| 30 | Tabla 46: Duración de CFR para animales tratados con Plavix™ (ND = no realizado)                                                                                                                                                                                                                           |
|    | Tabla 47: Duración de CFR para animales tratados con Reopro™ (ND = no realizado)                                                                                                                                                                                                                           |
|    | Tabla 48: Duración de CFR para animales tratados con ALX-0081 (ND = no realizado)                                                                                                                                                                                                                          |
| 35 | Tabla 49: Babuinos usados con los diferentes compuestos de prueba en el estudio de Folts                                                                                                                                                                                                                   |
| 40 | Tabla 50: Inhibición de CFR en el modelo de Folts para los diferentes fármacos sometidos a prueba. El número de experimentos en los que se observó una inhibición de CFR en las diferentes condiciones mencionadas se muestra en función del número total de repeticiones independientes de esa condición. |
|    | Tabla 51: Duración de CFR (segundos) para cada babuino y cada dosis de Aspegic, heparina, Plavix y ALX-0081. La dosis eficaz se indica en amarillo                                                                                                                                                         |
| 45 | Tabla 52: Pérdida de sangre en relación con la segunda gasa de control para animales tratados con Plavix™ en función de la dosis final (DE = desviación estándar)                                                                                                                                          |
|    | Tabla 53: Pérdida de sangre en relación con la segunda gasa de control para animales tratados con Reopro™ en función de la dosis final (DE = desviación estándar)                                                                                                                                          |
| 50 | Tabla 54: Pérdida de sangre en relación con la segunda gasa de control para animales tratados con ALX-0081 en función de la dosis final (DE = desviación estándar)                                                                                                                                         |
| 55 | Tabla 55: El promedio de la cantidad total de pérdida de sangre (= suma de pérdida de sangre de las primeras cinco dosis de compuesto de prueba) en relación con la segunda gasa de control                                                                                                                |
|    | Tabla 56: Pérdida de sangre en gasas en relación con la segunda gasa de control para cada babuino tratado con Aspegic, heparina, Plavix y ALX-0081 en función de la dosis de fármaco. La dosis de fármaco eficaz en la que se observó una inhibición completa de CFR se indica en amarillo                 |
| 60 | Tabla 57: % de agregación plaquetaria inducida por ristocetina para cada babuino tratado con Aspegic, heparina, Plavix y ALX-0081 en función de la dosis de fármaco                                                                                                                                        |
| 65 | Tabla 58: Concentración de ALX-0081 [µg/ml] en muestras de sangre obtenidas a los 10 minutos tras la administración                                                                                                                                                                                        |

Tabla 59: Duración de CFR [segundos] para babuinos tratados con ALX-0081 y con vWF

Tabla 60: Volúmenes [ $\mu$ l] para preparar las diferentes mezclas para el estudio de la escisión de A1A2A3 por ADAMTS13.

## Ejemplos

### A. Selección y examen de nanobodies específicos para vWF e inhibición de la adhesión plaquetaria

#### Ejemplo 1: Nanobodies monovalentes específicos de antígeno

Los Nanobodies representados en la tabla 8, SEQ ID No: 60 a 66 se obtienen a partir de llamas inmunizadas con vWF humano o con dominio A1 recombinante de vWF. Los Nanobodies se unen al dominio A1 de vWF e inhiben la interacción entre vWF y gplb en las plaquetas.

#### Ejemplo 2: Expresión y purificación de nanobodies

Se preparó el plásmido (QIAGEN, según las instrucciones del fabricante) y se transformó en células electrocompetentes WK6 o TG1. Se usó una única colonia para iniciar un cultivo durante la noche en LB que contenía glucosa al 2 % y ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Este cultivo durante la noche se diluyó 100 veces en 2  $\times$  300 ml de medio TB que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml, y se incubó a 37 °C hasta DO600 nm = 0,5. Se añadió IPTG 1 mM y se incubó el cultivo durante 3 horas más a 37 °C o durante la noche a 28 °C.

Se centrifugaron los cultivos durante 20 minutos a 10000 rpm a 4 °C. Se congeló el sedimento durante la noche o durante 1 hora a -20 °C. A continuación, se descongeló el sedimento a temperatura ambiente durante 40 minutos, se resuspendió en 20 ml de tampón peri (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y NaCl 300 mM) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se aisló la fracción periplásmica mediante centrifugación durante 20 minutos a 4 °C a 20000 rpm. Se purificaron los Nanobodies sobre una columna de níquel (TALON, Clontech) tal como describe el fabricante y se calcularon los rendimientos de expresión tal como se representa en la tabla 9.

#### Ejemplo 3: Unión de nanobodies a vWF en ELISA

Se sometieron a prueba los Nanobodies del ejemplo 1 para determinar su unión a vWF en ELISA. Por tanto, se recubrió una placa de microtitulación (Nunc, Maxisorb) con vWF (Red Cross) a una dilución de 200 veces y se precalentó durante 15 minutos a 37 °C. Se recubrió la placa durante la noche a 4 °C. Entonces se lavó la placa con PBS-Tween y se bloqueó durante dos horas a temperatura ambiente con PBS-caseína al 1 %. Tras lavar, se aplicaron las muestras comenzando a una concentración de 10  $\mu$ g/ml y se realizaron diluciones de 3 veces en PBS. Tras un periodo de incubación de dos horas, se lavaron las placas y se aplicó anticuerpo monoclonal de ratón anti-myc anticuerpo a una dilución de 1000 veces durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se aplicó anticuerpo policlonal anti-ratón-HRP (DAKO) a una dilución de 1000 veces durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se aplicó el sustrato ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se midió la DO 405 nm. Los resultados se muestran en la figura 1.

#### Ejemplo 4: Inhibición de la adhesión plaquetaria mediante nanobodies en una cámara de flujo

Se analizaron las muestras de proteína en una cámara de perfusión. Se empaparon cubreobjetos Thermanox (Nunc) durante la noche en etanol al 80 %, se enjuagaron concienzudamente con agua destilada y se secaron al aire. Se solubilizó colágeno tipo III placentario humano (Sigma) en ácido acético 0,05 mol/l y se pulverizó sobre los cubreobjetos a una densidad final de 30  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> con un aerógrafo de retoque. Tras pulverizar, se bloquearon los cubreobjetos con disolución de albúmina humana al 1 % en PBS durante al menos 1 hora a TA. Se realizaron perfusiones con una cámara de perfusión de un único paso en condiciones de flujo no pulsátil usando una cámara de perfusión pequeña modificada con una altura de rendija de 0,1 mm y una anchura de rendija de 2 mm. Se obtuvo sangre mediante punción venosa de voluntarios sanos y se sometió a anticoagulación con Penta/PPACK. Se insertaron cubreobjetos por triplicado en la cámara. Se precalentaron cinco mililitros de sangre a 37 °C durante 5 minutos con o sin la adición de 2 microgramos/ml de nanobody y luego se hicieron circular a través de la cámara durante 5 minutos a una velocidad de cizalladura de pared de 1600 s<sup>-1</sup> usando una bomba de infusión. Tras una ronda de perfusión, se tomó el cubreobjetos de la cámara, se enjuagó en solución salina tamponada con Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), se fijó en glutaraldehído al 0,5 % en PBS, se deshidrató en metanol y se tiñó por May-Grünwald y Giemsa (Riedel de Haën). Se evaluó la deposición de plaquetas como cobertura de superficie por plaquetas usando un microscopio óptico y análisis asistido por ordenador. Los resultados se muestran en la tabla 10. Los Nanobodies 12B6 y 12A5 inhiben claramente la adhesión plaquetaria a colágeno tipo III en la cámara de perfusión a alta velocidad de cizalladura.

#### Ejemplo 5: Análisis en BIACORE para determinar la unión a vWF para nanobodies homólogos



Los Nanobodies 12B6 y 12A5 inhiben la adhesión plaquetaria en la cámara de perfusión. Se obtuvieron secuencias homólogas de la llama que comprenden las diferencias de aminoácido mostradas en la tabla 11, SEQ ID No 67 a 73. Las figuras 2 y 3 representan la alineación de las secuencias de Nanobodies homólogas 12A5 y 12B6.

Se unió covalentemente vWF a la superficie del chip sensor por medio de acoplamiento de amina. Se activó la superficie CM5 del chip mediante la inyección de EDC/NHS (mezcla 1:1 de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida 0,4 M y N-hidroxisuccinimida 0,1 M en agua) durante 7 minutos. Tras la activación, se inyectó vWF hasta que se detectó un aumento de 6000 unidades de respuesta. Se desactivó el exceso de grupos reactivos con etanolamina-HCl 1 M (pH 8,5) durante 7 minutos. Se mantuvo la velocidad de flujo constante durante el procedimiento de inmovilización a 5 ul/min. El tampón eluyente era HEPES 0,01 M (pH 7,4) con NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005 %.

Los Nanobodies 12B6 y 12A5 y sus proteínas homólogas se analizaron en BIACORE sobre vWF a una concentración del Nanobody de 5 µg/ml tal como se muestra en las figuras 4 y 5. Los valores de asociación, disociación y KD estimados se representan en las tablas 12 y 13. Los Nanobodies 12A5 y 12B5 tienen las mejores velocidades de asociación y disociación. Los Nanobodies 12A2 y 12B6 tienen la mejor velocidad de asociación, las velocidades de disociación son muy comparables para todos los nanobodies sometidos a prueba.

La tabla 14 muestra el valor de KD real para vWF en BIACORE usando un intervalo de concentraciones de los nanobodies. A partir del conjunto de curvas que se generaron para cada nanobody, solo se usaron las curvas en las que se alcanzó el equilibrio, para derivar el valor de KD por medio de la afinidad en estado estacionario.

Para el tratamiento de acontecimientos agudos, la inhibición rápida de vWF es muy importante, y por tanto se prefiere una velocidad de asociación rápida. La velocidad de asociación determina la rapidez que un Nanobody se une a su diana (vWF) cuando se inyecta en un humano o animales.

#### Ejemplo 6: Comparación de la inhibición de nanobodies para la potencia en la cámara de perfusión

Para comparar la potencia de la inhibición de la adhesión plaquetaria, se sometieron a prueba los Nanobodies 12A2, 12B6 y 12A5 en la cámara de perfusión a 0,2, 0,4 y 0,6 µg/ml. Se realizó el experimento usando el mismo donante para todos los nanobodies. Los resultados se muestran en la tabla 15 y la figura 6. Los Nanobodies muestran una capacidad de inhibición muy comparable en la cámara de perfusión, con inhibición completa de la adhesión plaquetaria a una concentración de nanobody de 0,6 µg/ml.

#### Ejemplo 7: Estabilidad de nanobodies a temperaturas elevadas

Se preparó una disolución madre de nanobodies a una concentración de 200 µg/ml en PBS y se dividió en varios tubos. Se incubó cada tubo que contenía nanobody a diferentes temperaturas durante 1 hora, luego se enfrió a temperatura ambiente durante 2 horas y se puso a 4 °C durante la noche. El día siguiente, se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a 13000 rpm, y se sometió a prueba el sobrenadante para determinar la DO 280 nm. Se midió la concentración de sobrenadantes espectrofotométricamente y se expresó como un porcentaje de la concentración a temperatura ambiente. Los resultados se resumen en la tabla 16.

También se sometieron a prueba los sobrenadantes en ELISA para determinar la unión a vWF tal como se describió anteriormente en el ejemplo 3. Tal como se muestra en las figuras 7a (12B6), 7b (12A2) y 7c (12A5), los Nanobodies son muy estables a temperaturas elevadas.

#### Ejemplo 8: Reactividad cruzada de los Nanobodies con vWF de otras especies

Se recubrió una placa de microtitulación con anticuerpo de ratón anti-myc a 1/1000 durante la noche a 4 °C. Se lavó la placa con PBS-Tween y se bloqueó durante dos horas a temperatura ambiente con PBS-caseína al 1 %. Tras lavar, se aplicaron los Nanobodies a una concentración de 10 µg/ml en PBS. Tras un periodo de incubación de una hora, se lavaron las placas y se aplicó plasma (perro, cerdo, humano, babuino y mono cynomolgus) comenzando a una dilución de cinco veces y haciendo diluciones de dos veces adicionales en PBS. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se aplicó anticuerpo policlonal anti-vWF-HRP (DAKO) a una dilución de 2000 veces durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se aplicó el sustrato ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se midió la DO 405 nm.

Tal como se muestra en las figuras 8a (12B6), 8b (12A2) y 8c (12A5), los nanobodies 12A5, 12A2 y 12B6 tienen reactividad cruzada con vWF de humano, babuino y mono cynomolgus. Los Nanobodies 12A2 y 12B6 tienen también reactividad cruzada con vWF de cerdo. Estos nanobodies pueden por tanto someterse a prueba para determinar su eficacia y seguridad en cerdos. Ninguno de los Nanobodies tiene reactividad cruzada con vWF de perro.

#### B. Construcción de nanobodies bivalentes específicos para vWF e inhibición de la adhesión plaquetaria

Ejemplo 9: Secuencias de aminoácidos de los nanobodies bivalentes

La tabla 17, SEQ ID No 74 a 82 representa nanobodies bivalentes contruidos para 12B6, 12A2 y 12A5. Los Nanobodies se unieron con los ligadores representados en la tabla 18, SEQ ID No 83 a 85.

Ejemplo 10: Expresión y purificación de los nanobodies bivalentes

Se realizaron las expresiones tal como se describió anteriormente en el ejemplo 2. Los rendimientos de expresión se resumen en la tabla 19.

Ejemplo 11: Análisis de los nanobodies bivalentes en BIACORE

Se analizaron los nanobodies bivalentes del ejemplo 9 en BIACORE a 1,3 nM tal como se describió anteriormente en el ejemplo 5 para comparar las afinidades por vWF frente al nanobody monovalente. Los nanobodies bivalentes 12B6 (figura 9), 12A2 (figura 10) y 12A5 (figura 11) tienen una afinidad mejorada por vWF en comparación con el nanobody monovalente.

Ejemplo 12: Estabilidad de los nanobodies bivalentes a temperaturas elevadas

Se midió la estabilidad de los nanobodies bivalentes tal como se describió anteriormente en el ejemplo 7. Se midió la concentración (µg/ml) de los sobrenadantes y se expresó como un porcentaje de la concentración a temperatura ambiente. Los resultados se resumen en la tabla 20 (bivalente 12B6), tabla 21 (bivalente 12A2) y tabla 22 (bivalente 12A5).

Se sometieron a prueba los sobrenadantes en ELISA para determinar la unión a vWF tal como se describió anteriormente en el ejemplo 3. Se aplicaron los sobrenadantes comenzando a una dilución 1/100 y se prepararon diluciones 1/5 en PBS. Los resultados se muestran en la figura 12 (12B6), figura 13 (12A2) y figura 14 (12A5).

Ejemplo 13: Análisis de 12A2 monovalente y bivalente en la cámara de flujo

Se sometió a prueba el Nanobody 12A2 (formas monovalente y bivalente) en la cámara de perfusión tal como se describió anteriormente en el ejemplo 4. Se realizó el experimento usando el mismo donante para todos los nanobodies. Los resultados se resumen en la tabla 23. Los nanobodies bivalentes inhiben la adhesión plaquetaria más eficazmente que la forma monovalente.

C. Humanización de nanobodies específicos para vWF e inhibición de la adhesión plaquetariaEjemplo 14: Humanización del nanobody 12B6

La tabla 24, SEQ ID No: 86 a 89 representa cuatro nanobodies 12B6 humanizados. La tabla II enumera los cambios de aminoácido que se realizaron para lograr estas secuencias. La figura 15 representa la alineación de las secuencias humanizadas para 12B6.

Tabla II: Sustituciones humanizantes no limitativas

|        | Q1E | A14P | A17S | E44G | D46E | R76N | M77S | A82bS | K83R | P84A |
|--------|-----|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|
| 12B6H1 | X   | X    | X    | X    |      |      |      | X     | X    | X    |
| 12B6H2 | X   | X    | X    | X    | X    |      |      | X     | X    | X    |
| 12B6H3 | X   | X    | X    | X    |      | X    |      | X     | X    | X    |
| 12B6H4 | X   | X    | X    | X    |      |      | X    | X     | X    | X    |

Se realizaron las expresiones tal como se describió en el ejemplo 2. Los rendimientos de expresión se resumen en la tabla 25.

Se midió la estabilidad de los nanobodies humanizados tal como se describió en el ejemplo 7. La tabla 26 resume las concentraciones de DO 280 nm (µg/ml) de los sobrenadantes expresadas como un porcentaje de la concentración a temperatura ambiente.

La figura 16 muestra la unión de nanobodies 12B6 humanizados a vWF en ELISA realizado tal como se describió en el ejemplo 3.

Se determinó la afinidad de nanobodies 12B6 humanizados por vWF en BIACORE. Los valores de KD se resumen en la tabla 27.

#### Ejemplo 15: Humanización del nanobody 12A2

La tabla 28, SEQ ID No: 90 a 94 representa cinco nanobodies 12A2 humanizados. Las tablas III y IV enumeran los siguientes cambios de aminoácido que se realizaron para lograr estas secuencias. La figura 17 representa la alineación de las secuencias humanizadas para 12A2.

Tabla III: Sustituciones humanizantes no limitativas:

|         | Q1E | K3Q | E5V | A14P | A17S | R27F | E44G | D46E |
|---------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 12A2H1  | X   | X   | X   | X    | X    |      | X    | X    |
| 12A2H3  | X   | X   | X   | X    | X    |      | X    | X    |
| 12A2H4  | X   | X   | X   | X    | X    |      | X    | X    |
| 12A2H11 | X   | X   | X   | X    | X    | X    | X    | X    |
| 12A2H13 | X   | X   | X   | X    | X    | X    | X    | X    |

Tabla IV:

|         | R76N | M77S | N82bS | K83R | P84A | Q108L |
|---------|------|------|-------|------|------|-------|
| 12A2H1  |      |      | X     | X    | X    |       |
| 12A2H3  | X    |      | X     | X    | X    |       |
| 12A2H4  |      | X    | X     | X    | X    |       |
| 12A2H11 |      |      | X     | X    | X    |       |
| 12A2H13 | X    | X    | X     | X    | X    | X     |

Se realizaron las expresiones tal como se describió en el ejemplo 2. Los rendimientos de expresión se resumen en la tabla 29.

Se midió la estabilidad de los nanobodies humanizados tal como se describió en el ejemplo 7. La tabla 30 resume las concentraciones de DO 280 nm ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los sobrenadantes expresados como un porcentaje de la concentración a temperatura ambiente. Todos los nanobodies 12A2 humanizados son muy estables tras calentamiento a temperaturas crecientes.

Se realizó el ELISA de las figuras 18 y 19 tal como se describió en el ejemplo 3. 12A2H1 y 12A2H4 se unen muy bien a vWF en ELISA.

Se sometieron a prueba los Nanobodies en la cámara de flujo a una concentración de 0,7  $\mu\text{g/ml}$  y 1,5  $\mu\text{g/ml}$ . Se usó el mismo donante para todos los experimentos. Se realizó el experimento tal como se describió en el ejemplo 4. Los resultados se resumen en las tablas 31 y 32.

Se determinó la afinidad de nanobodies 12A2 humanizados por vWF en BIACORE. Los valores de KD se resumen en la tabla 33.

#### Ejemplo 16 (referencia): Humanización del nanobody 12A5

La tabla 34, SEQ ID No: 95 a 97 representa tres nanobodies 12A5 humanizados. La tabla V enumera los cambios de aminoácido que se realizaron para lograr estas secuencias. La figura 20 representa la alineación de las secuencias humanizadas para 12A5.

Tabla V: Sustituciones humanizantes no limitativas:

|        | A1E | L23A | Q44G | G73N | P74A | K83R | P84A |
|--------|-----|------|------|------|------|------|------|
| 12A5H1 | X   | X    | X    |      |      | X    | X    |
| 12A5H2 | X   | X    | X    |      | X    | X    | X    |

|        |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| 12A5H3 | X | X | X | X | X | X | X |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|

Se realizaron las expresiones tal como se describió anteriormente en el ejemplo 2. Los rendimientos de expresión tras la purificación con TALON se resumen en la tabla 35 para cada nanobody 12A5 humanizado.

5 Se midió la estabilidad de los nanobodies 12A5 humanizados tal como se describió anteriormente en el ejemplo 7. Se midió la DO280 de los sobrenadantes y se expresó como un porcentaje de la DO280 a temperatura ambiente. Los resultados se resumen en la tabla 36. Todos los nanobodies 12A5 humanizados son estables de manera comparable tras calentamiento a temperaturas crecientes con respecto al tipo natural.

10 Se realizó ELISA tal como se describió en el ejemplo 3. La figura 21 ilustra la actividad de unión para vWF en ELISA.

Se determinó la afinidad de nanobodies 12A5 humanizados por vWF en BIACORE. Los valores de KD se resumen en la tabla 37.

#### 15 Ejemplo 17: Nanobodies humanizados bivalentes

Se seleccionaron tres nanobodies humanizados 12A2H1, 12A2H4 y 12B6H2 para la forma bivalente con el ligador 3a. Las secuencias de estos 3 nanobodies difieren solo en unos pocos aminoácidos tal como se muestra en la figura 22. La tabla 38, SEQ ID No 98 a 100 enumera las secuencias de los nanobodies bivalentes. La tabla 38, SEQ ID No 101 - a 106 enumera las secuencias de nanobodies bivalentes humanizados unidos con el ligador GS9 y GS30, respectivamente.

25 Se realizaron las expresiones tal como se describió en el ejemplo 2. Se purificaron los Nanobodies que contenían una etiqueta de (His)<sub>6</sub> sobre una columna de níquel (TALON, Clontech) tal como describió el fabricante. La secuencia de etiqueta es EQKLISEEDLNGAA<sub>HHHHHH</sub>. Se purificaron Nanobodies sin etiquetas sobre proteína A. Se calcularon los rendimientos de expresión y se resumen en la tabla 39.

30 Se midió la estabilidad de los nanobodies humanizados bivalentes tal como se describió en el ejemplo 7. Se midió la DO280 de los sobrenadantes y se expresó como un porcentaje de la DO280 a temperatura ambiente. Los resultados se resumen en la tabla 40.

35 Se sometieron a prueba los Nanobodies (humanizados pero también de tipo natural) en la cámara de flujo a una concentración de 0,15 µg/ml, 0,3 µg/ml y 0,6 µg/ml. Se usó el mismo donante para todos los experimentos. Se realizó el experimento tal como se describió en el ejemplo 4. La figura 23 muestra la adhesión plaquetaria a diferentes concentraciones de nanobodies bivalentes. La tabla 41 enumera la adhesión plaquetaria de nanobodies bivalentes humanizados y de tipo natural.

#### D. Efecto de un nanobody (bivalente) sobre la trombosis arterial en un modelo de FOLTS de babuino

#### 40 Ejemplo 18: Modelo de Folts de babuino con ALX-0081

En este estudio, se evaluaron la eficacia y seguridad de ALX-0081 en un modelo de trombosis de Folts en babuinos.

45 Además, se compararon la eficacia y seguridad de ALX-0081 en un modelo de trombosis de Folts en babuinos con otros fármacos usados actualmente en la clínica, tales como Reopro, Plavix, Aspegic, heparina y epinefrina. Se diluyeron todos estos en cloruro de sodio al 0,9 % y se administraron como inyecciones en bolo intravenosas. Este estudio estaba diseñado también para determinar la dosis eficaz para cada uno de estos compuestos.

50 Finalmente, se sometió a prueba la eficacia en un modelo de trombosis de Folts en babuinos de una combinación de fármacos que está usándose actualmente en la clínica en un entorno de intervención coronaria percutánea (PCI): Aspegic, heparina y Plavix. Se evaluó además si ALX-0081 puede mejorar la eficacia de esta combinación cuando se añade encima.

55 Se observaron los parámetros de seguridad tales como inducción de hemorragia, niveles de vWF y factor VIII, y recuento de plaquetas, PT y aPTT.

#### Protocolo del estudio

60 El protocolo del estudio que se aplicó es el modelo de Folts original y algunas modificaciones descritas más adelante (Folts JD, *et al*, Circulation. 1976; 54:365-370).

Se usaron babuinos (*Papio ursinus*) macho y hembra sanos. Los animales pesaban 8-17 kg y estaban libres de enfermedad durante al menos 2 semanas antes de su uso. Se alimentó a los babuinos solo con alimento convencional seco. Se usaron los babuinos a diferentes puntos de tiempo. El peso de los babuinos se resume en la

tabla 42 (estudio de eficacia ALX-0081 y comparación con fármacos individuales) y la tabla 50 (eficacia de una combinación de fármacos y ALX-0081 encima de esta combinación).

Se anestesiaron los animales y se mantuvo la temperatura corporal a 37 °C con una mesa de calentamiento. Se diseccionó un segmento de una arteria femoral liberándola del tejido circundante. Se colocó una derivación entre la vena femoral y la arteria femoral para obtener altas velocidades de cizalladura. Se registró el flujo de sangre medio y fásico de manera continua a lo largo de todo el experimento. Se registró el flujo de nivel inicial durante 20 minutos. Entonces se lesionó el sitio de disección proximal de la arteria femoral aplicando dos oclusiones solapantes de la arteria durante 1 segundo usando unas pinzas. Se colocó una mordaza sobre el sitio lesionado para crear una estenosis externa.

Se observó una disminución gradual del flujo de sangre debido a adhesión y agregación plaquetaria. Cuando el flujo se redujo a cero, se restauró el flujo de sangre abriendo la mordaza para desprender el trombo rico en plaquetas. Este patrón repetitivo de flujo de sangre decreciente tras restauración mecánica se denomina reducciones cíclicas del flujo (CFR). Se repitió una lesión endotelial adicional si era necesario para obtener finalmente CFR estables en estos babuinos. El número de veces que es necesario desprender el trombo determina el número de CFR. La figura 24 ilustra el patrón de flujo de sangre durante el modelo de Folts en babuinos.

Tras un periodo de control de 30 minutos de CFR reproducibles, se administró el vehículo como control interno y se siguieron los CFR durante 30 minutos más. Tras este periodo, se proporcionaron agentes de prueba (solución salina ( $n = 2$ ), Reopro ( $n = 3$ ), Aspegic ( $n = 3$ ), Plavix ( $n = 4$ ), heparina ( $n = 3$ ) o Nanobody™ ALX-0081 ( $n = 9$ )) por medio de una inyección en bolo intravenosa (seguido por una infusión continua para ALX-0081) y se continuó la monitorización hasta 30 minutos tras la administración del fármaco. Se repitió este procedimiento varias veces con dosis en aumento de la sustancia de prueba. Se cuantificó el efecto antitrombótico comparando la duración de los CFR antes y después de la administración del fármaco. Cuando se observó inhibición completa de CFR, se aplicó una nueva lesión con el fin de confirmar que la inhibición era un efecto del tratamiento pero no un fenómeno de curación natural. Al final de los experimentos, se inyectó epinefrina (2,2 µg/kg/min) con el fin de distinguir entre una inhibición débil y fuerte de los CFR. De hecho, se ha demostrado antes que los CFR reaparecen en presencia de epinefrina cuando se usa aspirina (un fármaco antiplaquetario débil) en el mismo modelo. La configuración del experimento se ilustra en la figura 25.

La duración de los CFR, tras cada dosis de compuesto de prueba, se resume en las tablas 43-48. Las dosis a las que se obtiene inhibición completa de los CFR están sombreadas.

En las figuras 26-31 se muestra una lectura representativa del flujo de sangre durante los experimentos de modelo de Folts.

Los resultados demuestran que los CFR pueden obtenerse en los animales de control durante al menos 3 horas, sin la necesidad de una nueva lesión entre medias. La duración media de los CFR es de 2-5 minutos y no hay ningún efecto sobre la duración de los CFR mediante inyección de solución salina (figura 26, tabla 43).

#### *Aspegic*

Se les inyectó a tres animales Aspegic (aspirina inyectable) y se buscó la inhibición de CFR. En la práctica clínica, se administra una inyección en bolo de 250 mg ( $\pm$  3-5 mg/kg) al paciente, justo antes del inicio de un procedimiento de intervención coronaria percutánea (PCI). En dos animales (babuinos 3 y 5) no pudo obtenerse inhibición de CFR a dosis tan altas como 80 y 40 mg/kg de Aspegic respectivamente (figura 27, tabla 44). En el babuino 4, fue muy difícil establecer un patrón repetitivo estable de CFR en la fase de control. Tras realizarse varias lesiones nuevas (esto es en el momento en el que se inyectó solución salina), se obtuvieron CFR estables. Se obtuvo inhibición completa de los CFR a la dosis de 5 mg/kg de Aspegic, pero a dosis superiores y tras una nueva lesión, los CFR regresaron, aunque la duración media de los CFR era 3-4 veces más larga que antes de la administración de Aspegic. Tras la infusión de epinefrina, los CFR regresaron inmediata y completamente (tabla 44).

#### *Heparina*

Se les inyectó a tres animales heparina no fraccionada y se buscó la inhibición de CFR. En la práctica clínica, se administra una inyección en bolo de 60-70 UI/kg al paciente, y se monitoriza el aPTT (tiempo de tromboplastina parcial activada) cada 30 minutos. Se administra heparina extra si el aPTT es <250 segundos. En los babuinos 7 y 8, no pudo obtenerse inhibición de los CFR incluso ni a dosis tan altas como 240 UI/kg (figura 28, tabla 45). En el babuino 6, se obtuvo inhibición completa de los CFR a la primera dosis de 15 UI/kg y a dosis superiores, pero cuando se hizo una nueva lesión los CFR regresaron cada vez. A la dosis más alta de 240 UI/kg, los CFR se inhibieron incluso tras una nueva lesión, pero el flujo estaba descendiendo y tras la infusión de epinefrina, los CFR regresaron inmediatamente.

*Plavix*

Se trataron cuatro babuinos con Plavix y se usaron para el estudio de Folts. Se usó Plavix como fármaco inyectable resuspendiendo comprimidos en metanol. Por tanto, se fue capaz de realizar un experimento de aumento de la dosis como para los otros fármacos. En pacientes, se administran 300-600 mg de Plavix por vía oral, puede observarse inhibición de la agregación plaquetaria 2 horas tras dosis orales individuales de Plavix. Ya a la dosis final de 2,5 mg/kg en los babuinos, pudo demostrarse un efecto sobre la duración de los CFR, pero este efecto inhibitor se inició solo 10 minutos tras la inyección (figura 29, tabla 46). En el babuino 12, se obtuvo una inhibición completa de los CFR a esta dosis de 2,5 mg/kg. En los otros tres babuinos, se obtuvo inhibición completa de los CFR a la dosis final de 5 mg/kg. Los CFR permanecieron inhibidos cuando se realizó una nueva lesión, pero regresaron tras la infusión de epinefrina. Cuando se detuvo la infusión de epinefrina, los CFR permanecieron durante otros 5 minutos, pero se obtuvo de nuevo entonces inhibición completa (figura 29).

*Reopro*

Se sometió a prueba Reopro para determinar la eficacia en el modelo de Folts en tres babuinos. En la práctica clínica, los pacientes recibieron una dosis de 250 µg/kg seguido por una infusión continua de 7,5 µg/kg/hora. Esta es también la dosis que se necesitaba en los babuinos 13, 14 y 15 para obtener la inhibición completa de los CFR (dosis final de 170-420 µg/kg (figura 30, tabla 47). Se les administró a los babuinos solo una inyección en bolo. Cuando se aplicó una nueva lesión, se retuvo la inhibición completa de los CFR y la infusión de epinefrina no pudo revertir esta inhibición (figura 30).

*ALX-0081*

Nueve babuinos recibieron ALX-0081 y se usaron en el modelo de Folts. En todos los babuinos se obtuvo inhibición completa de los CFR a la dosis de 30 µg/kg + 45 µg/kg/hora (dosis final de 43 µg/kg). En 2 babuinos, se obtuvo ya inhibición completa a la dosis de 10 µg/kg + 15 µg/kg/hora (babuinos 17 y 22). Se retuvo la inhibición tras una nueva lesión y tras la infusión de epinefrina en los nueve babuinos (figura 31, tabla 48).

*Combinaciones de Aspegic-heparina-Plavix-ALX-0081 (Asp/Hep/Plav/ALX)*

Siete babuinos recibieron una inyección en bolo de aspirina 5 mg/kg, heparina 60 UI/kg y dosis crecientes de Plavix. Se administró heparina extra a diferentes puntos de tiempo para sostener un determinado nivel (aPTT debe al menos doblarse frente al control). Se monitorizaron los CFR durante 30 minutos tras cada dosis de compuestos de prueba. Se inició a una dosis de 1 mg/kg de Plavix y se añadió 1 mg/kg tras 30 minutos. Se cuantificó el efecto antitrombótico comparando la duración de los CFR antes y después de la administración del fármaco. Cuando se observó inhibición completa de los CFR, se aplicó una nueva lesión. Se inyectó epinefrina y se continuó hasta el final del experimento. Si no regresaron los CFR, se aplicó una nueva lesión. Tras 2-3 CFR, se añadieron dosis crecientes de ALX-0081: (1), 3, 10 o 30 µg/kg. Se esperó tras cada dosis de ALX-0081 durante 2 CFR y se aumentó la dosis hasta que se obtuvo la inhibición completa de los CFR. A la inhibición completa de los CFR, se inició la infusión continua de 1,5 veces la dosis de ALX-0081/kg/hora durante 30 minutos y se continuó la infusión de epinefrina. Se aplicó una nueva lesión tras 10-15 minutos. Las especificaciones de los babuinos que se usaron en este estudio se representan en la tabla 49.

Los resultados de estos estudios para cada compuesto de prueba se resumen individualmente en la tabla 50. Se observa un claro efecto antitrombótico superior en el modelo de babuino de trombosis de Folts para ALX-0081 y Reopro en comparación con aspirina, heparina o Plavix: tras una nueva lesión y tras la infusión de epinefrina, los CFR no regresan en el modelo de Folts en los babuinos tratados con ALX-0081 y Reopro en contraposición al modelo en animales tratados con Aspegic, heparina o Plavix. La dosis de ALX-0081 requerida para la inhibición completa de los CFR es aproximadamente 10 veces menor que la dosis necesaria para Reopro. Por tanto, se concluye que ALX-0081 es más potente que Reopro.

Tras la administración de una combinación de aspirina 5 mg/kg, heparina 60 UI/kg y dosis crecientes de Plavix, en los siete babuinos se obtuvo inhibición completa de los CFR a esta dosis final. La dosis de Plavix requerida para la inhibición completa es 2,5 veces menor que la dosis necesaria cuando se administra Plavix solo. Para todos los babuinos sometidos a prueba, los CFR no regresaron cuando se realizó una nueva lesión (figura 32). Sin embargo, tras la inyección de epinefrina, los CFR regresaron espontáneamente en los babuinos 5, 8, 9 y 10 y tras una nueva lesión en los babuinos 4, 6 y 7. Se inyectó heparina extra al mismo tiempo que la epinefrina. Tras 2 CFR, se administraron dosis crecientes de ALX-0081 mientras se continuaba la infusión de epinefrina. La dosis de ALX-0081 se aumentó desde 1 sobre 3-10 hasta 30 µg/kg. Cuando se obtuvo inhibición completa de los CFR, se inició una infusión continua de ALX-0081 a 1,5 veces la dosis eficaz/kg/hora. En los siete babuinos, se obtuvo inhibición completa de los CFR a la dosis de 30 µg/kg. Esta dosis eficaz de ALX-0081 es la misma que la requerida para la inhibición completa de los CFR en el modelo de Folts cuando se administró ALX-0081 solo.

Por tanto, puede concluirse que la eficacia de ALX-0081 no aumenta por la infusión simultánea de Plavix, heparina y Aspegic. Esta observación está completamente en línea con la hipótesis de los inventores: ALX-0081 inhibe la primera interacción entre plaquetas y el colágeno expuesto en la pared arterial dañada. Plavix y Aspegic, por otro

lado, inhiben en dirección 3' adicionalmente en la cascada que conduce al desarrollo de un trombo. Por tanto, Plavix y aspirina no contribuyen a una mejor eficacia ya que ALX-0081 interfiere ya con la primera etapa en la formación de trombos. Además, cuando se aplicó una nueva lesión a la dosis eficaz de ALX-0081, los CFR no regresaron, lo que demuestra un potente efecto antitrombótico de este Nanobody™. Los resultados se resumen en la tabla 51.

## Mediciones

Se midieron los siguientes parámetros: a) análisis de hemorragia, b) concentración de vWF, niveles de factor VIII y recuento de plaquetas, PT y aPTT c) agregación plaquetaria inducida por ristocetina d) concentración de ALX-0081, y e) análisis de secciones arteriales para detectar reestenosis, f) inmunogenicidad de ALX-0081.

### a) Análisis de hemorragia

Para analizar la hemorragia, se hizo una incisión con un bisturí en la ingle. Se realizó esto a los 15 minutos tras el registro del flujo de nivel inicial, cuando se realizó la lesión en la arteria. Se insertaron gasas en la herida y se reemplazaron cada 30 minutos junto antes de cada nueva dosis de compuesto de prueba. Se determinó la cantidad de pérdida de sangre tras cada dosis de compuesto de prueba pesando las gasas. La pérdida de sangre se expresa en relación con la cantidad de pérdida de sangre en la segunda gasa de control (durante la inyección de solución salina) (tablas 52-54).

Para todos los babuinos tratados con Plavix y Reopro, la pérdida de sangre es alta (hasta 9-40 veces respectivamente a la dosis más alta), partiendo de la dosis eficaz en adelante. Para animales tratados con ALX-0081, la hemorragia es menor que en los animales tratados con Plavix, y meno menor en comparación con animales tratados con Reopro.

Con el fin de determinar el nivel de seguridad frente a eficacia de Plavix, Reopro y ALX-0081 como fármacos antitrombóticos, se muestran los promedios de pérdida de sangre en relación con la segunda gasa de control para estos fármacos en función de la dosis de fármaco como múltiplo de la dosis eficaz (figura 33). La dosis eficaz para Plavix es de 5 mg/kg, para Reopro de 250 µg/kg y para ALX-0081 de 30 µg/kg (tabla 46-48). Estos resultados demuestran con precisión la seguridad superior de ALX-0081 en comparación con Reopro y Plavix: la ventana en la que podría administrarse ALX-0081 sin un aumento importante en la hemorragia es mucho más amplia en comparación con Plavix y Reopro.

Los resultados de los promedios de pérdida de sangre en las gasas (si están disponibles) se combinaron con los promedios de las longitudes de los CFR en las figuras 34-36.

Se observó una ventana terapéutica amplia para ALX-0081 en el modelo de Folts: pudo demostrarse un fuerte efecto antitrombótico sin ninguna hemorragia importante para dosis acumuladas que oscilaban entre 43 µg/kg y 403 µg/kg (figura 36). Sin embargo, en contraposición, la ventana terapéutica para Reopro y Plavix en el mismo modelo fue mucho más estrecha en comparación con ALX-0081, combinando un efecto antitrombótico eficaz con una alta pérdida de sangre (figura 34-35).

El promedio de la cantidad total de pérdida de sangre (= suma de pérdida de sangre de las gasas de las primeras cinco dosis de compuesto de prueba) en relación con la segunda gasa se resume en la tabla 55. En esta tabla se indica también la dosis final como múltiplo de la dosis eficaz (= suma de las cinco dosis dividida entre la dosis eficaz). Tal como se mencionó anteriormente, la dosis eficaz para Plavix es de 5 mg/kg, para Reopro de 250 µg/kg y para ALX-0081 de 30 µg/kg.

Los resultados mostrados en la tabla 55 muestran claramente que la pérdida de sangre total aumenta significativamente en los animales tratados con Plavix e incluso en un mayor grado en los animales tratados con Reopro. La pérdida de sangre en animales que recibieron ALX-0081 es 2 veces y 4 veces menor que en animales tratados con Plavix o Reopro, respectivamente. Esto demuestra claramente de nuevo que ALX-0081 es más seguro que Plavix y Reopro en cuanto a riesgo de hemorragia, aunque se usaron dosis de más de 10 veces la dosis eficaz.

La combinación eficaz de Aspegic, heparina y Plavix da como resultado un aumento de la pérdida de sangre de hasta 14 veces en comparación con la gasa de control (tabla 56). La adición de ALX-0081 encima de la combinación de Aspegic, heparina y Plavix no da como resultado un aumento de la hemorragia excepto para los babuinos 4 y 7. En el babuino 7, la hemorragia aumentó mucho más tras la administración de epinefrina, heparina extra y ninguna dosis eficaz de ALX-0081, pero fue inferior de nuevo tras la administración de la dosis eficaz de ALX-0081. Estos resultados demostraron que ALX-0081 es seguro cuando se añade encima de la combinación de fármacos que está usándose actualmente en un entorno clínico.

### b) Concentración de vWF, nivel de factor VIII, recuento de plaquetas, PT y aPTT

#### vWF

Se determinaron los niveles de vWF en el plasma rico en plaquetas (PRP) de muestras de sangre tomadas tras la administración de las diferentes dosis de los fármacos en el modelo de Folts usando un ensayo de inmunoabsorción y se expresaron como un porcentaje del patrón humano (5.º patrón internacional de la OMS para factor VIII y VWF)

Los resultados demuestran claramente que los diferentes fármacos usados en modelo no tienen un efecto importante sobre el nivel de vWF.

#### *Factor VIII*

Se determinaron los niveles de factor VIII en el PRP de muestras de sangre tomadas tras la administración de las diferentes dosis de los fármacos en el modelo de Folts usando la prueba de aPTT. No se sometieron a prueba las muestras de plasma de los babuinos tratados con heparina, ya que se demostró que la heparina prolonga el tiempo de aPTT. Se expresaron los niveles de FVIII como un porcentaje de la primera muestra de control, tomada 10 minutos tras la lesión de la arteria femoral. No se observó ningún efecto de los tratamientos sobre la prueba de aPTT.

#### *Recuento de plaquetas, PT y aPTT*

Se realizaron las mediciones de recuento de plaquetas durante los experimentos de modelo de Folts. Los datos mostraron que el babuino 15 tiene un recuento de plaquetas muy bajo en comparación con los otros animales. Los recuentos de plaquetas para todas las clases de tratamientos, excepto para el tratamiento con Plavix, son muy comparables a lo que se observa en los animales de control y son bastante constantes a lo largo del tiempo.

Los valores de PT no demuestran un efecto de los compuestos de prueba sobre el tiempo de PT, excepto para babuinos tratados con la dosis de 240 UI/kg de heparina en donde se observó un aumento minoritario en PT.

Se resumen los valores de aPTT observados durante los estudios de modelo de Folts. Estos resultados indican que los compuestos de prueba no tienen efecto sobre los valores de aPTT, excepto para los babuinos tratados con heparina. En estos animales, los valores de aPTT se prolongan desde la dosis de 30-60 UI/kg en adelante, tal como se observa también en los pacientes. La heparina actúa como anticoagulante formando un complejo con antitrombina y catalizando la inhibición de factores de coagulación sanguínea activados tales como XIa, IXa, Xa y trombina (factor IIa). Todos estos factores están implicados en la cascada de coagulación intrínseca cuya funcionalidad se mide en la prueba de aPTT.

c) Medición de la agregación plaquetaria inducida por ristocetina en sangre obtenida de babuinos tratados con ALX-0081

Se analizó la sangre obtenida de babuinos tratados con ALX-0081 para determinar la inhibición de la agregación plaquetaria. Se realizaron agregaciones plaquetarias en un agregómetro óptico y de sangre completa Chronolog (modelo 560CA, Chronolog, EE. UU.). Se preparó PRP (recogido sobre citrato 0,38 mol/l), centrifugando la sangre completa a 1200 rpm durante 5 minutos. Se retiró cuidadosamente la fracción superior que contenía el PRP. Se centrifugó adicionalmente la fracción inferior a 3000 rpm durante 10 minutos para preparar plasma pobre en plaquetas (PPP). Se contaron las plaquetas en PRP y se diluyeron en PPP hasta una concentración final de 200 000 plaquetas por microlitro. Se añadió ristocetina 3 mg/ml (DAKO) y se midió la agregación.

La agregación plaquetaria *ex vivo* se mide en las muestras de sangre tomadas durante el experimento de Folts en los babuinos tratados con ALX-0081. Se mide la agregación plaquetaria dependiente de GPIb-IX-V a través de vWF usando ristocetina como modulador. Se mide el % de agregación a cada punto de tiempo y a cada dosis. La muestra de control se toma a los 10 minutos tras la lesión arterial.

Se comparan los resultados de la prueba de RIPA con la inhibición de los CFR para cada babuino tratado con ALX-0081 (figura 37). Tal como se muestra en la figura 37, se observa una relación inversa entre el RIPA y la duración de los CFR. Además, estos resultados demuestran que se obtiene inhibición completa en la prueba de RIPA a dosis menores que la inhibición completa de los CFR en los babuinos 16, 18, 19 y 23. Para los babuinos 20, 21, 22 y 24, los resultados con RIPA se comparan muy bien con los resultados para la eficacia en el modelo de Folts.

#### *d) Concentración de ALX-0081*

Se recubrieron placas de microtitulación con anticuerpo policlonal de ratón anti-myc durante la noche a 4 °C a una dilución de 1000 veces. Se lavaron las placas con PBS-Tween y se bloquearon durante 2 horas a TA con PBS-caseína al 1 %. Se diluyen las muestras en una placa de microtitulación no recubierta en plasma de babuino de referencia al 25 %. Se prepara la curva patrón diluyendo el Nanobody en la misma muestra de plasma de babuino de referencia. Se aplican las muestras sobre las placas recubiertas con anticuerpo anti-myc y se permite que se unan durante 2 horas a TA. Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween. Se aplica anticuerpo de conejo anti-vWF-HRP (DAKO) a una dilución de 3000 veces durante una hora a TA. Para la medición de DO 405 nm, se lavan



las muestras 5 veces con PBS-Tween y se añade el sustrato ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Se determinó la concentración de ALX-0081 en muestras de plasma tomadas a los 10 minutos tras cada inyección en bolo. La inyección en bolo iba seguida inmediatamente por una infusión continua. Las concentraciones (µg/ml) se resumen en la tabla 58.

Para todos los babuinos, se midió un nivel creciente de ALX-0081 en las muestras de plasma mediante ELISA tras el aumento de la dosis de ALX-0081. Para el babuino 16, se determinaron cantidades superiores de manera constante de ALX-0081 en la muestra de plasma tomada tras la dosis de 10 µg/kg en comparación con la muestra tomada tras 30 µg/kg. El nivel de ALX-0081 en esa muestra es también sustancialmente mayor de lo que se observa para todos los demás babuinos a los que se les administra el mismo programa de dosificación de ALX-0081. Puesto que los niveles de ALX-0081 para el babuino 16 tras las dosis superiores están en línea con las expectativas, se supone que una anomalía durante la toma de muestras de sangre explica este resultado atípico.

La concentración de ALX-0081 para cada dosis en los diferentes babuinos es variable. Para la dosis de 3 µg/kg, la concentración oscila entre 0,03 y 0,14 µg/ml para 10 µg/kg entre 0,18 y 1,23 µg/ml, para 30 µg/kg entre 0,51 y 1,14 µg/ml, para 90 µg/kg entre 1,38 y 6,77 µg/ml y para 270 µg/kg entre 4,03 y 35,14 µg/ml. En figura 38, se representa gráficamente la concentración de ALX-0081 en plasma frente a la duración de los CFR.

La concentración de ALX-0081 requerida para la inhibición completa de los CFR es de entre 0,3 y 0,5 µg/ml, lo que concuerda completamente con la concentración requerida para inhibir la adhesión plaquetaria a colágeno en la cámara de flujo a alta velocidad de cizalladura, cuando se hacen adiciones conocidas de ALX-0081 en sangre humana. En azul (figura 38, panel B) se indica el intervalo de concentración de ALX-0081 en donde comienza la inhibición (omitiendo la dosis de 10 µg/kg en el babuino 16).

Cuando se representa gráficamente la concentración de ALX-0081 frente a la cantidad relativa de pérdida de sangre de las gasas, se observa un aumento de más de 2 veces en la hemorragia a dosis por encima de 1 µg/ml (figura 39). Se observó un aumento de 10 veces en la pérdida de sangre cuando la concentración de ALX-0081 es de 19 µg/ml, que es 40-60 veces la concentración eficaz.

#### e) Análisis de secciones arteriales para detectar reestenosis

Cuatro semanas después del tratamiento de la segunda arteria, se diseccionan las arterias liberándolas del tejido circundante. Se ata la arteria en el sitio por encima y por debajo de la lesión endotelial incluyendo el sitio en el que se colocó la derivación. Se retira una sección de 2 centímetros, se corta en una parte inferior (sitio de derivación) y superior (sitio estenosado y lesionado) y se almacena en formaldehído al 10 %. Entonces se sacrifican los babuinos mediante inyección de eutanasia. Se marcan las arterias según su origen y se cortan en anillos de 2 mm cada uno. Se colocan los anillos en casetes marcados adecuados para procesamiento histológico. Entonces se colocan los casetes durante la noche en un procesador VIP Tissue Tek automatizado tras el programa de procesamiento durante la noche tal como se describe en Bancroft (Bancroft, John D., Stevens Alan (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Tercera edición).

Tras el procesamiento, se incrustan las arterias en bloques de cera de parafina marcados y se enfrían sobre una placa de congelación. Los bloques de cera se cortan secciones en serie de 4 micrómetros cada una en un micrótomos rotatorio. Se recogen las secciones sobre portaobjetos de vidrio y se tiñen para la evaluación histológica. Se realizan el método de hematoxilina y eosina así como el de Verhoeff para tinciones de fibras elásticas en cada una de las arterias (Bancroft, John D., Stevens Alan (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Tercera edición). Tras teñir, los portaobjetos se deshidratan, se aclaran, se montan y se marcan. Se realiza análisis ciego de las secciones.

#### f) Análisis de inmunogenicidad

Se evaluó la presencia de inmunoglobulinas de ALX-0081 en plasma de tres babuinos mediante dos métodos, respectivamente un método de ELISA y un método basado en SPR sobre Biacore. Se trataron los babuinos durante 8 semanas con dosis crecientes de ALX-0081 (partiendo de 10 µg/kg). Durante dichas 8 semanas, no pudo observarse respuesta inmunogénica tras la inyección de ALX-0081. La semivida de ALX-0081 osciló entre 7 y 9 horas.

#### Ejemplo 20: Uso de vWF como antídoto para ALX-0081

A pesar de la seguridad demostrada de ALX-0081 en babuinos, y el rápido aclaramiento del Nanobody™, se decidió evaluar el uso de vWF como antídoto para ALX-0081. Se sometió a prueba esto en un modelo de Folts en babuinos en donde se evaluó si el efecto inhibitor de ALX-0081 sobre la formación de trombos arteriales puede revertirse mediante la inyección de vWF.

El procedimiento experimental siguió el modelo de Folts original con las modificaciones descritas en el ejemplo 18 previo.

Se usaron babuinos (*Papio ursinus*) macho sanos en este estudio. Los animales pesaban 9-12 kg y estaban libres de enfermedad durante al menos 2 semanas antes de su uso. Se alimentó a los babuinos solo con alimento convencional seco.

Se usaron tres babuinos en este estudio, la duración de los CFR durante la fase de control, tras la administración de solución salina, ALX-0081 y vWF se resume en la tabla 59.

En la figura 40 se muestra el flujo de sangre en función del tiempo para cada babuino y experimento.

En los tres babuinos, se obtuvo inhibición completa de los CFR a la dosis de 30 µg/kg + 45 µg/kg/hora de ALX-0081, incluso cuando se aplicó una nueva lesión, los CFR no regresaron. Tras la inyección de la primera dosis de vWF (250 UI), el flujo disminuyó gradualmente, pero los CFR no regresaron hasta que se administró una dosis extra de 250 UI de vWF. Este resultado demostró con precisión que la actividad de ALX-0081 puede revertirse mediante la administración de vWF, y que por tanto, vWF sería un buen antídoto para este Nanobody™.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de vWF, de un fragmento adecuado del mismo, de DDAVP (desmopresina) o un fragmento adecuado de la misma, o de una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anteriores, como antídoto para complicaciones o efectos secundarios no deseados asociados con el uso de un Nanobody, proteína o polipéptido contra vWF, en particular un Nanobody, proteína o polipéptido tal como se describe en el presente documento.

#### Ejemplo 21: Efectos de ALX-0081 sobre la adhesión plaquetaria a ULvWF derivado de células endoteliales y sobre la actividad de ADAMTS-13

Este estudio sirve como prueba de concepto para el uso de ALX-0081 como fármaco en pacientes con TTP. Se realizan perfusiones de plaquetas reconstituidas en plasma de TTP (sin ADAMTS13) sobre células endoteliales que secretan ULvWF, en ausencia y presencia de ALX-0081. En un experimento diferenciado se sometió a prueba si ALX-0081, que se une al dominio A1 de vWF, interfiere con la actividad de ADAMTS-13. ADAMTS-13 se une a y escinde el dominio A2 de vWF.

Se obtuvieron células endoteliales a partir de venas de cordones umbilicales humanos mediante el método de Maruyama (Z.Zellforsch. Mikrosk. A4nat. 60:69; 1963). Se activaron las células endoteliales con histamina 100 µM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de los experimentos de perfusión.

Se extrajo sangre de voluntarios sanos que negaron la ingestión de aspirina u otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) durante los 10 días anteriores en un volumen de un décimo de citrato de sodio al 3,4 %. Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de sangre completa mediante centrifugación (10 minutos a 200 g a temperatura ambiente). Se acidificó el PRP mediante la adición de un volumen de un décimo de ACD (citrato de trisodio al 2,5 %, ácido cítrico al 1,5 % y D-glucosa al 2 %), y se centrifugaron las plaquetas (500 g, 15 minutos). Se resuspendió el sedimento de plaquetas en tampón HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico)-Tyrode (HEPES 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,7 mM, D-glucosa 5 mM, pH 6,5). Se añadió prostaciclina (PGI<sub>2</sub>, 10 ng/ml) para prevenir la activación plaquetaria durante la etapa de lavado posterior. Se centrifugaron las plaquetas y se resuspendieron en un pequeño volumen de tampón HEPES-Tyrode. Esta suspensión de plaquetas se diluyó en tampón HEPES a pH 7,4, o en plasma de TTP.

Se realizaron perfusiones en una cámara de perfusión de un solo paso tal como se describió previamente. Al experimento le siguió videomicroscopía en tiempo real.

En un segundo tipo de experimento, se prepararon diferentes mezclas de reacción tal como se resume en la tabla 60, sin embargo, sin la adición del constructo A1A2A3. El constructo A1A2A3 es un fragmento recombinante que consiste en el dominio A1, A2 y A3 de vWF. Se preincubaron las mezclas durante 5 minutos a 37 °C tras lo cual se añade el fragmento A1A2A3 y se incuba la mezcla en un baño de agua durante la noche a 37 °C. Al siguiente día se ejecuta una SDS-PAGE reductora sobre las muestras (al 12 %, y usando como marcador los patrones Precision Plus Protein de BioRad) y se sometió a inmunotransferencia sobre Immobilon-FL (Millipore). Se bloqueó la inmunotransferencia durante 2 horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (tampón de bloqueo Odyssey 1:1 en 1 × TBS pH = 7,4) y se incubó con anticuerpo policlonal de conejo anti-vWF (DAKO). Se usó anticuerpo de cabra anti-conejo Alexa Fluor 680 para la detección. Se realizó barrido en el instrumento ODYSSEY para detectar los productos de degradación.

#### *Experimento de control: unión de plaquetas a ULvWF*

Se aislaron células endoteliales de cordones umbilicales humanos recién obtenidos mediante digestión con colagenasa del interior de la vena umbilical. Se hicieron crecer las células en cultivo tisular como una población

homogénea. Se hacen crecer células endoteliales humanas cultivadas como monocapas de células grandes estrechamente opuestas, poligonales y contienen inclusiones citoplasmáticas (cuerpos de Weibel-Palade). Células endoteliales estimuladas con histamina aisladas de cordones umbilicales humanos expresan factor de von Willebrand ultra grande (ULvWF) sobre su superficie. La perfusión de estas células estimuladas con plaquetas sanguíneas aisladas, que están suspendidas en o bien tampón o bien plasma de un paciente con TTP adquirida, da como resultado la deposición de plaquetas sobre el ULvWF (8). Estas plaquetas adheridas a ULvWF aparecen como los denominados "cordones", que son visibles cuando se monitoriza el experimento de perfusión mediante videomicroscopía en tiempo real (figura 41).

#### *Inhibición mediante ALX-0081 para la generación de cordones de plaquetas*

Se resuspendieron plaquetas en tampón o en plasma de TTP y las concentraciones de ALX-0081 usadas en este experimento fueron de 0,2, 2 y 10 µg/ml. Las células endoteliales estimuladas con histamina aisladas de cordones umbilicales humanos se perfunden con estas suspensiones de plaquetas tal como se describió anteriormente.

La adición de ALX-0081 a plaquetas resuspendidas en tampón o en plasma de un paciente con TTP da como resultado una inhibición completa de la formación de cordones en todas las condiciones sometidas a prueba (figura 42). Se realizaron experimentos de perfusión a una tensión de cizalladura de 2,5 dyn/cm<sup>2</sup> durante 4 minutos. Durante esta perfusión de 4 minutos, se examinaron al menos 20 campos microscópicos, y en presencia del Nanobody™, no pudieron demostrarse cordones a todas las condiciones sometidas a prueba (figura 42).

#### *Escisión de ULvWF por ADAMTS-13*

ADAMTS-13 reduce el tamaño de multímeros de VWF grandes y ultragrandes a formas más pequeñas escindiendo específicamente el enlace peptídico Y842/M843 en el dominio A2 de VWF. Se usaron dos tipos de ensayos para evaluar el efecto de ALX-0081 sobre la escisión de ULvWF por ADAMTS-13: es decir un ensayo de perfusión y un ensayo que observa la escisión de un fragmento de vWF recombinante.

En un primer experimento, se generaron cordones mediante una perfusión de 4 minutos de plaquetas lavadas resuspendidas en tampón sobre células endoteliales estimuladas con histamina. Posteriormente, se eliminaron por lavado las plaquetas no adheridas mediante una perfusión de 4 minutos de tampón. Después de eso, se perfundió tampón durante otros 4 minutos, seguido por una perfusión de 4 minutos de plasma normal agrupado que contenía ADAMTS-13. Se observó el desprendimiento de los cordones de plaquetas tras la perfusión de plasma normal agrupado (figura 43). Se escindieron más del 95 % de los cordones tras la perfusión de 4 minutos.

En un experimento posterior, se generaron cordones mediante una perfusión de 4 minutos de plaquetas lavadas resuspendidas en tampón sobre células endoteliales estimuladas con histamina y se eliminaron por lavado las plaquetas no adheridas mediante una perfusión de 4 minutos de tampón como anteriormente. Después de eso, se perfundió ALX-0081 (10 µg/ml en tampón) durante 4 minutos, seguido por una perfusión de 4 minutos de plasma normal agrupado que contenía ALX-0081 (10 µg/ml = exceso molar de 10 veces con respecto a vWF) y ADAMTS-13. Pudo demostrarse claramente el desprendimiento de los cordones de plaquetas y el 95 % de los cordones se escindieron tras la perfusión de 4 minutos (figura 44).

Estos resultados demuestran claramente que ALX-0081 no tiene un efecto sobre la escisión de cordones de ULvWF por ADAMTS-13.

En un segundo ensayo, se mezcló un fragmento recombinante que contenía el dominio A1-A2-A3 de vWF con plasma normal agrupado (NPP) que contenía ADAMTS-13, dando como resultado la escisión proteolítica del fragmento que se observó mediante un análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se sometió a prueba la actividad de ADAMTS-13 en ausencia y presencia de ALX-0081 10 µg/ml. Tal como se indica en la figura 45, ALX-0081 no tiene efecto sobre la escisión del fragmento de vWF (carriles 6-7-8).

Con el fin de demostrar que la escisión observada es específica para ADAMTS-13, se realizó un experimento de control en presencia de EDTA ya que EDTA inhibe la actividad de ADAMTS-13. Tal como se esperaba, la presencia de EDTA en NPP dio como resultado la inhibición de la escisión del fragmento (figura 45, carril 4).

Este experimento demuestra de nuevo que ALX-0081 no tiene efecto sobre la actividad de ADAMTS-13.

**Tabla 8:** Lista de secuencias de Nanobodies anti-vWF

| Nombre | SEQ ID NO | Secuencia                                                                                                                          |
|--------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12A5   | 60        | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVATITSGGSTN<br>YADPVKGRFTISRDPKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGT<br>QVTVSS |

|       |    |                                                                                                                                       |
|-------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12B1  | 61 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYGMGWRQAPGKEREFVTSISWSGTYT<br>AYSDNVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAQSRYSNYYDHDDKYAYW<br>GGGTQVTVSS   |
| 12B6  | 62 | QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWRQAPGKERDVVAISRTGGST<br>YYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYN<br>FWGGGTQVTVSS |
| 12D11 | 63 | AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCTASERTTFSSYTLGWFRQAPGKEREFVGGISWSGVS<br>TDYAEFAKGRFTISRDAANTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAALGRYSNWRNIGQYDYW<br>GGGTQVTVSS  |
| 12E3  | 64 | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNGMGWRQAPGKEREFVTSISWSGSYT<br>AYADNVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPGDTAVYYCAAQSRYSNYYDHDDKYAYW<br>GGGTQVTVSS    |
| 12C9  | 65 | AVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGSIFSSSAMAQYRQASGKQRELVAITITSGGRTS<br>YADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYDCNFVVDGKRAPWGQGTQVTVSS             |
| 14F8  | 66 | AVQLVESGGGLVQAGESLRLSCTSSGRAFSYNTGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGLT<br>YYADSVKGRFTISRDNKDMVYLQMASLKPEDTAVYYCAANRRQKTVQMGERAYDYWG<br>QGTQVTVSS   |

**Tabla 9:** Rendimientos de expresión de Nanobodies anti-vWF

| Nanobody | Rendimiento (mg/l) tras TALON |
|----------|-------------------------------|
| 12A5     | 13                            |
| 12B1     | 6                             |
| 12B6     | 16                            |
| 12D11    | 8                             |
| 12E3     | 4                             |
| 12C9     | 25                            |
| 14F8     | 48                            |

**Tabla 10:** Adhesión plaquetaria en cámara de perfusión de Nanobodies anti-vWF

| Nanobody | Control | % de adhesión plaquetaria a 2 µg/ml |
|----------|---------|-------------------------------------|
| 12A5     | 60 ± 7  | 10 ± 3                              |
| 12B1     | 60 ± 7  | 56 ± 3                              |
| 12B6     | 60 ± 7  | 19 ± 5                              |
| 12D11    | 60 ± 7  | 61 ± 7                              |
| 12E3     | 60 ± 7  | 54 ± 1                              |
| 12C9     | 71 ± 3  | 68 ± 8                              |
| 14F8     | 71 ± 3  | 51 ± 10                             |

**Tabla 11:** Lista de secuencias de nanobodies homólogos a 12B6 y 12A5

| Nombre                      | SEQ ID NO | Secuencia                                                                                                                            |
|-----------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Secuencias homólogas a 12A5 |           |                                                                                                                                      |
| 12B4                        | 67        | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGLYRQAPGKQRELVAITITSGGSTN<br>YADSVKGRFTISRDGPKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFN<br>DYWGQGTQVTVSS |

|                           |    |                                                                                                                                          |
|---------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12E8                      | 68 | AVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGLYRQAPGKQRELVAITITSGGSTN<br>YADSVKGRFTISRDKAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGDYGYRFN<br>DYWGQGTQVTVSS     |
| 12A6                      | 69 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVAITITSGGSTN<br>YADSVKGRFTISRDKAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGDYGYRFN<br>DYWGQGTQVTVSS     |
| 12D8                      | 70 | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVAITITSGGSTN<br>YADSVKGRFTISRDKAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYANLKQGDYGYRFNDYWGQGT<br>QVTVSS     |
| 12B6 homologue secuencias |    |                                                                                                                                          |
| 12A2                      | 71 | QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGST<br>YYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYT<br>FWGQGTQVTVSS |
| 12F2                      | 72 | QVKLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGRERDVAAISRTGGST<br>YYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYT<br>FWGQGTQVTVSS  |
| 14H10                     | 73 | QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVAAISRTGGST<br>YYPDSVEGRFTISRDNARMVYLEMNNLSLKPDDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYT<br>FWGQGTQVTVSS |

**Tabla 12:** Valores de asociación, disociación y KD estimados para nanobodies homólogos a 12A5

| Nanobody | Disociación ( $\times 10^{-3}$ /s) | Asociación ( $\times 10^6$ 1/Ms) | KD (nM) |
|----------|------------------------------------|----------------------------------|---------|
| 12A5     | 2,51                               | 0,629                            | 3,98    |
| 12B4     | 2,2                                | 0,544                            | 4,05    |
| 12E8     | 2,93                               | 0,171                            | 17,1    |
| 12A6     | 4,72                               | 0,188                            | 25,1    |
| 12D8     | 5,84                               | 0,139                            | 41,9    |

**Tabla 13:** Valores de asociación, disociación y KD estimados para nanobodies homólogos a 12B6

| Nanobody | Disociación ( $\times 10^{-3}$ /s) | Asociación ( $\times 10^6$ 1/Ms) | KD (nM) |
|----------|------------------------------------|----------------------------------|---------|
| 12B6     | 5,97                               | 2,55                             | 2,33    |
| 12A2     | 3,49                               | 1,11                             | 3,13    |
| 12F2     | 4,04                               | 6,41                             | 6,3     |
| 14H10    | 3,97                               | 6,84                             | 5,81    |

**Tabla 14:** Valor de KD real de los nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5

| Nanobody | Disociación ( $\times 10^{-3}$ /s) | Asociación ( $\times 10^6$ 1/Ms) | KD (nM) |
|----------|------------------------------------|----------------------------------|---------|
| 12B6     | 10,03                              | 2,28                             | 4,5     |
| 12A2     | 9,9                                | 2,24                             | 4,4     |
| 12A5     | 3,3                                | 1,22                             | 2,7     |

**Tabla 15:** Adhesión plaquetaria en cámara de perfusión de nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5

|          | % de adhesión plaquetaria |                |                |                |
|----------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Nanobody | 0 $\mu$ g/ml              | 0,2 $\mu$ g/ml | 0,4 $\mu$ g/ml | 0,6 $\mu$ g/ml |

|         |        |        |         |        |
|---------|--------|--------|---------|--------|
| Control | 71 ± 3 | -      | -       | -      |
| 12B6    | -      | 59 ± 6 | 43 ± 7  | 27 ± 8 |
| 12A2    | -      | 58 ± 8 | 40 ± 10 | 11 ± 8 |
| 12A5    | -      | 50 ± 7 | 27 ± 10 | 2 ± 2  |

Tabla 16: Concentración de nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5 tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody | TA  | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|----------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12B6     | 100 | 97    | 100   | 104   | 94    | 91    | 68    |
| 12A2     | 100 | 106   | 104   | 100   | 93    | 87    | 90    |
| 12A5     | 100 | 108   | 107   | 98    | 83    | 75    | 66    |

Tabla 17: Lista de secuencias de nanobodies bivalentes

| Nombre         | SEQ ID NO | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12A2-3a-12A2   | 74        | QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLLKPEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGG<br>ALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVE<br>GRFTISRDNARMVYLQMNLLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE<br>YTFWGQGTQVTVSS                        |
| 12A2-GS9-12A2  | 75        | QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLLKPEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG<br>LVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTY<br>YPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV<br>RTLPSYTFWGQGTQVTVSS                   |
| 12A2-GS30-12A2 | 76        | QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLLKPEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG<br>SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFR<br>QAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLLK<br>PEGTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS |
| 12A5-3a-12A5   | 77        | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA<br>TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLLKPEDTAVYYCYAN<br>LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS<br>CLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISR<br>DPKNTVYLQMNLLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTV<br>SS                                      |
| 12A5-GS9-12A5  | 78        | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA<br>TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLLKPEDTAVYYCYAN<br>LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG<br>SLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGR<br>FTISRDPKNTVYLQMNLLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQ<br>GTQVTVSS                                |
| 12A5-GS30-12A5 | 79        | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA<br>TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLLKPEDTAVYYCYAN<br>LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG<br>GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQ<br>RELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLLKPEDTAVY<br>CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS                |

|                |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12B6-3a-12B6   | 80 | QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA<br>AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSSEYNFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGG<br>ALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVE<br>GRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSE<br>YNFWGQGTQVTVSS                         |
| 12B6-GS9-12B6  | 81 | QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA<br>AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG<br>LVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTY<br>YARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV<br>RTLPSSEYNFWGQGTQVTVSS                   |
| 12B6-GS30-12B6 | 82 | QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA<br>AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG<br>SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFR<br>QAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNALK<br>PEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSEYNFWGQGTQVTVSS |

**Tabla 18:** Lista de secuencias de secuencias de ligador

| Nombre | SEQ ID NO | Secuencia                     |
|--------|-----------|-------------------------------|
| 3a     | 83        | AAA                           |
| GS9    | 84        | GGGGSGGGG                     |
| GS30   | 85        | GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG |

**Tabla 19:** Rendimientos de expresión de nanobodies 12B6, 12A2 y 12A5 bivalentes

| Nanobody       | Rendimiento (mg/l) tras TALON u otra purificación |
|----------------|---------------------------------------------------|
| 12B6           | 16                                                |
| 12B6-3a-12B6   | 9                                                 |
| 12B6-GS9-12B6  | 16                                                |
| 12B6-GS30-12B6 | 17                                                |
| 12A2           | 18                                                |
| 12A2-3a-12A2   | 45                                                |
| 12A2-GS9-12A2  | 22                                                |
| 12A2-GS30-12A2 | 11                                                |
| 12A5           | 13                                                |
| 12A5-3a-12A5   | 10                                                |
| 12A5-GS9-12A5  | 11                                                |
| 12A5-GS30-12A5 | 18                                                |

**Tabla 20:** Concentración de nanobodies bivalentes 12B6 tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody     | TA  | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|--------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12B6         | 100 | 97    | 100   | 104   | 94    | 91    | 68    |
| 12B6-3a-12B6 | 100 | 103   | 96    | 87    | 9     | 8     | 6     |

|                |     |     |     |    |    |    |    |
|----------------|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| 12B6-GS9-12B6  | 100 | 103 | 94  | 88 | 19 | 8  | 7  |
| 12B6-GS30-12B6 | 100 | 100 | 100 | 98 | 46 | 14 | 11 |

**Tabla 21:** Concentración de nanobodies bivalentes 12A2 tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody       | TA  | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|----------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12A2           | 100 | 106   | 104   | 100   | 93    | 87    | 90    |
| 12A2-3a-12A2   | 100 | 87    | 88    | 91    | 55    | 50    | 43    |
| 12A2-GS9-12A2  | 100 | 102   | 113   | 138   | 91    | 13    | 15    |
| 12A2-GS30-12A2 | 100 | 115   | 93    | 116   | 81    | 49    | 34    |

**Tabla 22:** Concentración de nanobodies bivalentes 12A5 tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody       | RT  | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|----------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12A5           | 100 | 108   | 107   | 98    | 83    | 75    | 66    |
| 12A5-3a-12A5   | 100 | 101   | 114   | 29    | 6     | 4     | 6     |
| 12A5-GS9-12A5  | 100 | 104   | 115   | 32    | 13    | 14    | 10    |
| 12A5-GS30-12A5 | 100 | 104   | 87    | 7     | 6     | 35    | 21    |

**Tabla 23:** Adhesión plaquetaria en cámara de perfusión de nanobodies bivalentes 12A2

| Nanobody       | % de adhesión plaquetaria |           |           |           |
|----------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                | 0 µg/ml                   | 0,1 µg/ml | 0,2 µg/ml | 0,4 µg/ml |
| Control        | 81±5                      | -         | -         | -         |
| 12A2           | -                         | 78±2      | 72±6      | 61±8      |
| 12A2-3a-12A2   | -                         | 74±5      | 50±3      | 33±0      |
| 12A2-GS9-12A2  | -                         | 81±1      | 73±1      | 40±2      |
| 12A2-GS30-12A2 | -                         | 81±3      | 73±3      | 37±1      |

**Tabla 24:** Lista de secuencias de nanobodies 12B6 humanizados

| Nombre | SEQ ID NO | Secuencia                                                                                                                                 |
|--------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12B6H1 | 86        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVAIAISRTGGST<br>YYARSVEGRFTISRDNKRMVYLMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSEYN<br>FWGQGTQVTVSS   |
| 12B6H2 | 87        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAIAISRTGGST<br>YYARSVEGRFTISRDNKRMVYLMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSEYN<br>FWGQGTQVTVSS |
| 12B6H3 | 88        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVAIAISRTGGST<br>YYARSVEGRFTISRDNKRMVYLMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSEYN<br>FWGQGTQVTVSS   |
| 12B6H4 | 89        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVAIAISRTGGST<br>YYARSVEGRFTISRDNKRSVYLMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSEYN<br>FWGQGTQVTVSS   |

**Tabla 25:** Rendimientos de expresión de nanobodies 12B6 de tipo natural y humanizados

| Nanobody | Rendimiento (mg/l) tras TALON u otra purificación |
|----------|---------------------------------------------------|
|----------|---------------------------------------------------|



|        |    |
|--------|----|
| 12B6   | 16 |
| 12B6H1 | 3  |
| 12B6H2 | 9  |
| 12B6H3 | 8  |
| 12B6H4 | 3  |

**Tabla 26:** Concentración de nanobodies 12B6 de tipo natural y humanizados tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody | TA  | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|----------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12B6     | 100 | 97    | 100   | 104   | 94    | 91    | 68    |
| 12B6H1   | 100 | 101   | 100   | 97    | 45    | 58    | 54    |
| 12B6H2   | 100 | 97    | 96    | 96    | 83    | 46    | 53    |
| 12B6H3   | 100 | 101   | 98    | 97    | 74    | 73    | 65    |
| 12B6H4   | 100 | 101   | 100   | 93    | 41    | 66    | 54    |

**Tabla 27:** Valores de KD para nanobodies 12B6 de tipo natural y humanizados

| Nanobody | KD (nM) |
|----------|---------|
| 12B6     | 4,4     |
| 12B6H1   | 4,4     |
| 12B6H2   | 3,5     |
| 12B6H3   | 9       |
| 12B6H4   | 7,3     |

**Tabla 28:** Lista de secuencias de nanobodies 12A2 humanizados

| Nombre  | SEQ ID NO | Secuencia                                                                                                                                  |
|---------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12A2H1  | 90        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGG<br>STYYPDSVEGRFTISRDN AKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLP<br>SEYTFWGQGTQVTVSS |
| 12A2H3  | 91        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGG<br>STYYPDSVEGRFTISRDN AKNMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLP<br>SEYTFWGQGTQVTVSS |
| 12A2H4  | 92        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGG<br>STYYPDSVEGRFTISRDN AKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLP<br>SEYTFWGQGTQVTVSS |
| 12A2H11 | 93        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGG<br>STYYPDSVEGRFTISRDN AKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLP<br>SEYTFWGQGTQVTVSS |
| 12A2H13 | 94        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGG<br>STYYPDSVEGRFTISRDN AKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLP<br>SEYTFWGQGTQVTVSS |

**Tabla 29:** Rendimientos de expresión de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados

| Nanobody | Rendimiento (mg/l) tras TALON u otra purificación |
|----------|---------------------------------------------------|
| 12A2     | 18                                                |

|         |    |
|---------|----|
| 12A2H1  | 11 |
| 12A2H3  | 11 |
| 12A2H4  | 11 |
| 12A2H11 | 15 |
| 12A2H13 | 11 |

**Tabla 30:** Concentración de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody | TA  | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|----------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12A2     | 100 | 106   | 104   | 100   | 93    | 87    | 90    |
| 12A2H1   | 100 | 99    | 99    | 99    | 100   | 89    | 80    |
| 12A2H3   | 100 | 102   | 101   | 102   | 102   | 90    | 89    |
| 12A2H4   | 100 | 100   | 101   | 100   | 99    | 90    | 83    |
| 12A2H11  | 100 | 111   | 113   | 107   | 103   | 85    | 67    |
| 12A2H13  | 100 | 104   | 103   | 103   | 100   | 90    | 81    |

**Tabla 31:** Adhesión plaquetaria de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados en cámara de perfusión a 0,7 y 1,5 ug/ml

|          | % de adhesión plaquetaria |           |           |
|----------|---------------------------|-----------|-----------|
| Nanobody | 0 µg/ml                   | 0,7 µg/ml | 1,5 µg/ml |
| Control  | 73±4                      | -         | -         |
| 12A2     | -                         | 36±3      | 34±5      |
| 12A2H1   | -                         | 49±1      | 47±3      |
| 12A2H3   | -                         | 62±4      | 63±1      |
| 12A2H4   | -                         | 55±1      | 54±1      |
| 12A2H11  | -                         | 57±1      | 52±1      |
| 12A2H13  | -                         | 67±4      | 67±4      |

**Tabla 32:** Adhesión plaquetaria de nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados en cámara de perfusión a 0,5, 1 y 2 ug/ml

|          | % de adhesión plaquetaria |           |         |         |
|----------|---------------------------|-----------|---------|---------|
| Nanobody | 0 µg/ml                   | 0,5 µg/ml | 1 µg/ml | 2 µg/ml |
| Control  | 72±1                      | -         | -       | -       |
| 12A2     | -                         | 33±10     | 35±11   | 10±10   |
| 12A2H1   | -                         | 40±9      | 43±3    | 38±5    |
| 12A2H4   | -                         | 61±1      | 57±1    | 46±5    |

**Tabla 33:** Valores de KD para nanobodies 12A2 de tipo natural y humanizados

| Nanobody | KD (nM) |
|----------|---------|
| 12A2     | 3,1     |
| 12A2 H3  | 14,6    |
| 12A2 H11 | 10,6    |

|          |      |
|----------|------|
| 12A2 H13 | 38,8 |
|----------|------|

**Tabla 34:** Lista de secuencias de nanobodies 12A5 humanizados

| Nombre | SEQ ID NO | Secuencia                                                                                                                            |
|--------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12A5H1 | 95        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSI GAMGMYRQAPGKGRELVAITITSGGS<br>TNYADPVKGRFTISRDPKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYW<br>GQGTQVTVSS |
| 12A5H2 | 96        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSI GAMGMYRQAPGKGRELVAITITSGGS<br>TNYADPVKGRFTISRDPKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYW<br>GQGTQVTVSS |
| 12A5H3 | 97        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSI GAMGMYRQAPGKGRELVAITITSGGS<br>TNYADPVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYW<br>GQGTQVTVSS |

**Tabla 35:** Rendimientos de expresión de nanobodies 12A5 de tipo natural y humanizados

| Nanobody | Rendimiento (mg/l) tras TALON |
|----------|-------------------------------|
| 12A5     | 13                            |
| 12A5H1   | 8                             |
| 12A5H2   | 9                             |
| 12A5H3   | 11                            |

**Tabla 36:** Concentración de nanobodies 12A5 de tipo natural y humanizados tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12A5     | 108   | 107   | 98    | 83    | 75    | 66    |
| 12A5H1   | 99    | 91    | 86    | 60    | 69    | 63    |
| 12A5H2   | 99    | 108   | 90    | 58    | 67    | 60    |
| 12A5H3   | 101   | 97    | 97    | 67    | 73    | 64    |

**Tabla 37:** Valores de KD para nanobodies 12A5 de tipo natural y humanizados

| Nanobody | KD (nM) |
|----------|---------|
| 12A5     | 1,6     |
| 12A5H1   | 1,8     |
| 12A5H2   | 12,8    |
| 12A5H3   | ND      |

**Tabla 38:** Lista de secuencias de nanobodies bivalentes humanizados

| Nombre           | SEQ ID NO | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12A2H1-3a-12A2H1 | 98        | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA<br>AISRITGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRMVY LQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGGTQVTVSSAAA EVQLVESGGGLVQPGG<br>SLRLSCAASGRITFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRITGGSTYYPDSVE<br>GRFTISRDNKRMVY LQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE<br>YTFWGGTQVTVSS |

|                        |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12A2H4-3a-12A2H4       | 99  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQP<br>SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVE<br>GRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE<br>YTFWGQGTQVTVSS                           |
| 12B6H2-3a-12B6H2       | 100 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV<br>AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQP<br>SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVE<br>GRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE<br>YNFWGQGTQVTVSS                             |
| 12A2H1-GS9-<br>12A2H1  | 101 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTY<br>YPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV<br>RTLPSYTFWGQGTQVTVSS                    |
| 12A2H4-GS9-<br>12A2H4  | 102 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTY<br>YPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV<br>RTLPSYTFWGQGTQVTVSS                    |
| 12B6H2-GS9-<br>12B6H2  | 103 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV<br>AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG<br>LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTY<br>YARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV<br>RTLPSYTFWGQGTQVTVSS                      |
| 12A2H1-GS30-<br>12A2H1 | 104 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG<br>SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR<br>QAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS |
| 12A2H4-GS30-<br>12A2H4 | 105 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA<br>AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG<br>SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR<br>QAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS |
| 12B6H2-GS30-<br>12B6H2 | 106 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV<br>AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA<br>AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG<br>SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR<br>QAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS   |

Tabla 39: Rendimientos de expresión de nanobodies bivalentes humanizados

| Nanobody         | Etiquetas | Rendimiento (mg/l) |
|------------------|-----------|--------------------|
| 12A2H1-3a-12A2H1 | Sí        | 5                  |
| 12A2H1-3a-12A2H1 | No        | 6                  |

|                  |    |    |
|------------------|----|----|
| 12A2H4-3a-12A2H4 | Sí | 10 |
| 12A2H4-3a-12A2H4 | No | 7  |
| 12B6H2-3a-12B6H2 | Sí | 10 |
| 12B6H2-3a-12B6H2 | No | 2  |

**Tabla 40:** Concentración de nanobody bivalente humanizado tras calentamiento a temperaturas crecientes

| Nanobody         | Etiquetas | 37 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
|------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12A2H1-3a-12A2H1 | Sí        | 98    | 96    | 93    | 63    | 8     | 9     |
| 12A2H1-3a-12A2H1 | No        | 100   | 99    | 100   | 77    | 14    | 15    |
| 12A2H4-3a-12A2H4 | Sí        | 100   | 99    | 95    | 9     | 6     | 9     |
| 12A2H4-3a-12A2H4 | No        | 98    | 98    | 98    | 18    | 17    | 26    |
| 12B6H2-3a-12B6H2 | Sí        | 100   | 91    | 85    | 7     | 6     | 7     |
| 12B6H2-3a-12B6H2 | No        | 100   | 99    | 99    | 28    | 13    | 18    |

**Tabla 41:** Adhesión plaquetaria de nanobodies bivalentes de tipo natural y humanizados

| Nanobody         | % de adhesión plaquetaria |            |           |           |
|------------------|---------------------------|------------|-----------|-----------|
|                  | 0 µg/ml                   | 0,15 µg/ml | 0,3 µg/ml | 0,6 µg/ml |
| Control          | 65 ± 8                    | -          | -         | -         |
| 12B6-3a-12B6     | -                         | 50 ± 5     | 15 ± 6    | 8 ± 6     |
| 12B6H2-3a-12B6H2 | -                         | 53 ± 4     | 30 ± 16   | 17 ± 6    |
| 12A2-3a-12A2     | -                         | 36 ± 8     | 10 ± 8    | 4 ± 3     |
| 12A2H1-3a-12A2H1 | -                         | 54 ± 4     | 10 ± 11   | 12 ± 7    |
| 12A2H4-3a-12A2H4 | -                         | 38 ± 2     | 10 ± 6    | 8 ± 4     |

**Tabla 42:** Babuinos usados con los diferentes compuestos de prueba en el estudio de Folts

| ID de babuino | Sexo   | Peso [kg] | Pata izquierda | Pata derecha |
|---------------|--------|-----------|----------------|--------------|
| 1             | macho  | 9,8       |                | Control      |
| 2             | macho  | 10,0      |                | Control      |
| 13            | macho  | 12,4      |                | Reopro       |
| 14            | macho  | 9,5       |                | Reopro       |
| 15            | macho  | 10,8      |                | Reopro       |
| 16            | macho  |           | ALX-0081       |              |
| 17            | macho  | 15,6      |                | ALX-0081     |
| 18            | macho  | 17,2      |                | ALX-0081     |
| 20/22         | macho  | 12,7      | ALX-0081       | ALX-0081     |
| 21            | hembra | 8,0       |                | ALX-0081     |
| 23            | macho  |           |                | ALX-0081     |
| 24            | macho  | 9,4       | ALX-0081       |              |
| 3/19          | macho  | 15,2      | Aspegic        | ALX-0081     |
| 4             | hembra | 13,6      | Aspegic        |              |

|      |       |      |          |        |
|------|-------|------|----------|--------|
| 5    | macho | 17,4 | Aspegic  |        |
| 9    | macho | 13,2 | Plavix   |        |
| 6/10 | macho | 10,2 | heparina | Plavix |
| 7/11 | macho | 9,4  | heparina | Plavix |
| 8/12 | macho | 10,5 | heparina | Plavix |

Tabla 43: Duración de CFR (s) para animales de control (ND = no realizado)

| Control     |                 | ID de babuino |     |
|-------------|-----------------|---------------|-----|
| Dosis final | Dosis           | 1             | 2   |
| 0           | control         | 291           | 249 |
| 0           | solución salina | 294           | 278 |
| 0           | solución salina | 427           | 185 |
| 0           | solución salina | 285           | 203 |
| 0           | solución salina | 438           | 175 |

Tabla 44: Duración de CFR para animales tratados con Aspegic™ (ND = no realizado)

| Aspegic     |                 | ID de babuino |         |     |
|-------------|-----------------|---------------|---------|-----|
| Dosis final | Dosis           | 3             | 4       | 5   |
| 0           | control         | 88            | sin CFR | 148 |
| 0           | solución salina | 147           | 204     | 184 |
| 1 mg/kg     | 1 mg/kg         | 149           | 164     | 135 |
| 2,5 mg/kg   | 1,5 mg/kg       | 102           | 325     | 115 |
| 5 mg/kg     | 2,5 mg/kg       | 102           | 1800    | 245 |
| 10 mg/kg    | 5 mg/kg         | 113           | 905     | 156 |
| 20 mg/kg    | 10 mg/kg        | 125           | 657     | 169 |
| 40 mg/kg    | 20 mg/kg        | 110           | ND      | 145 |
| 80 mg/kg    | 40 mg/kg        | 129           | ND      | ND  |
| Epinefrina  |                 | ND            | 161     | ND  |

Tabla 45: Duración de CFR para animales tratados con Heparin™ (ND = no realizado)

| Heparina    |                 | ID de babuino |     |     |
|-------------|-----------------|---------------|-----|-----|
| Dosis final | Dosis           | 6             | 7   | 8   |
| 0           | control         | 232           | 113 | 166 |
| 0           | solución salina | 298           | 131 | 246 |
| 15 UI/kg    | 15 UI/kg        | 630           | 208 | 255 |
| 30 UI/kg    | 30 UI/kg        | 355           | 241 | 320 |
| 60 UI/kg    | 60 UI/kg        | 432           | 246 | 332 |
| 120 UI/kg   | 120 UI/kg       | 610           | 160 | 206 |
| 240 UI/kg   | 240 UI/kg       | >1800         | 221 | 169 |
| Epinefrina  |                 | 109           | 65  | ND  |

Tabla 46: Duración de CFR para animales tratados con Plavix™ (ND = no realizado)

| Plavix      |                 | ID de babuino |       |       |       |
|-------------|-----------------|---------------|-------|-------|-------|
| Dosis final | Dosis           | 9             | 10    | 11    | 12    |
| 0           | control         | 215           | 178   | 84    | 144   |
| 0           | solución salina | 168           | 160   | 88    | 189   |
| 1 mg/kg     | 1 mg/kg         | 189           | ND    | 132   | 179   |
| 2,5 mg/kg   | 1,5 mg/kg       | 883           | 400   | 258   | >1800 |
| 5 mg/kg     | 2,5 mg/kg       | >1800         | >1800 | >1800 | >1800 |
| 10 mg/kg    | 5 mg/kg         | >1800         | >1800 | >1800 | >1800 |
| 20 mg/kg    | 10 mg/kg        | >1800         | >1800 | >1800 | >1800 |
| Epinefrina  |                 | 241           | 91    | 83    | 66    |

Tabla 47: Duración de CFR para animales tratados con Reopro™ (ND = no realizado)

| Reopro      |                 | ID de babuino |       |       |
|-------------|-----------------|---------------|-------|-------|
| Dosis final | Dosis           | 13            | 14    | 15    |
| 0           | control         | 144           | 90    | 308   |
| 0           | solución salina | 141           | 103   | 268   |
| 20 µg/kg    | 20 µg/kg        | 98            | 82    | 254   |
| 70 µg/kg    | 50 µg/kg        | 90            | 90    | 248   |
| 170 µg/kg   | 100 µg/kg       | 90            | >1800 | >1800 |
| 420 µg/kg   | 250 µg/kg       | >1800         | >1800 | >1800 |
| 920 µg/kg   | 500 µg/kg       | >1800         | >1800 | >1800 |
| Epinefrina  |                 | >1200         | >1200 | >1200 |

Tabla 48: Duración de CFR para animales tratados con ALX-0081 (ND = no realizado)

| ALX-0081    |                     | ID de babuino |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------|---------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Dosis final | Dosis               | 16            | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    | 23    | 24    |
| 0           | control             | 168           | 293   | 185   | 90    | 94    | 117   | 188   | 164   | 161   |
| 0           | solución salina     | 151           | 236   | 242   | 117   | 98    | 107   | 233   | 105   | 178   |
| 3 µg/kg     | 3 micro-gramos/kg   | 193           | ND    | ND    | 144   | 133   | 183   | 312   | 112   | 295   |
| 13 µg/kg    | 10 micro-gramos/kg  | 913           | >1800 | 298   | 237   | 620   | 525   | >1800 | 213   | 380   |
| 43 µg/kg    | 30 micro-gramos/kg  | >1800         | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 |
| 133 µg/kg   | 90 micro-gramos/kg  | >1800         | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 |
| 403 µg/kg   | 270 micro-gramos/kg | >1800         | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 |
| Epinefrina  |                     | >1200         | >1200 | >900  | >900  | >900  | >900  | >900  | >900  | >900  |

Tabla 49: Babuinos usados con los diferentes compuestos de prueba en el estudio de Folts

| ID de babuino | Sexo   | Peso [kg] | Mezcla           |
|---------------|--------|-----------|------------------|
| 1             | Macho  | 9,8       | Asp/Hep/Plav/ALX |
| 2             | Hembra | 13,6      | Asp/Hep/Plav/ALX |
| 3             | Hembra | 7,8       | Asp/Hep/Plav/ALX |
| 4             | Macho  | 12,1      | Asp/Hep/Plav/ALX |
| 5             | Macho  | 11,4      | Asp/Hep/Plav/ALX |
| 6             | Macho  | 11,4      | Asp/Hep/Plav/ALX |
| 7             | Macho  | 14,0      | Asp/Hep/Plav/ALX |

Tabla 50: Inhibición de CFR en el modelo de Folts para los diferentes fármacos sometidos a prueba. El número de experimentos en los que se observó una inhibición de CFR en las diferentes condiciones mencionadas se muestra en función del número total de repeticiones independientes de esa condición.

| Compuesto de prueba | Inhibición de CFR | Inhibición de CFR tras una nueva lesión | Inhibición de CFR tras la administración de epinefrina | Dosis eficaz |
|---------------------|-------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------|
| Control             | 0/2               | ND                                      | ND                                                     | -            |
| Aspegic             | 0/3               | 0/3                                     | 0/1                                                    | -            |
| heparina            | 1/3               | 1/3                                     | 0/2                                                    | -            |
| Plavix              | 4/4               | 4/4                                     | 0/4                                                    | 5 m/kg       |

|          |     |     |     |                                      |
|----------|-----|-----|-----|--------------------------------------|
| Reopro   | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 170-420 µg/kg                        |
| ALX-0081 | 9/9 | 9/9 | 9/9 | 13-43 µg/kg +<br>1,5 × dosis/kg/hora |

Tabla 51: Duración de CFR (segundos) para cada babuino y cada dosis de Aspegic, heparina, Plavix y ALX-0081. La dosis eficaz se indica en amarillo

|                                                       | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| control                                               | 82    | 99    | 109   | 95    | 113   | 142   | 113   |
| solución salina                                       | 113   | 119   | 108   | 114   | 131   | 168   | 92    |
| Aspegic 5 mg/kg + Heparina 60 UI/kg + Plavix 1 mg/kg  | 153   | 135   | 272   | 742   | 146   | 219   | 223   |
| + Plavix 1 mg/kg                                      | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 |
| Epinefrina + dosis no eficaces de ALX-0081 + heparina | 250   | 72    | 87    | 95    | 106   | 105   | 105   |
| Epinefrina + dosis eficaz de ALX-0081                 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 | >1800 |

Tabla 52: Pérdida de sangre en relación con la segunda gasa de control para animales tratados con Plavix™ en función de la dosis final (DE = desviación estándar)

| Plavix      |           | ID de babuino |     |     |      |          |     |
|-------------|-----------|---------------|-----|-----|------|----------|-----|
| Dosis final | Dosis     | 9             | 10  | 11  | 12   | Promedio | DE  |
| 1 mg/kg     | 1 mg/kg   | 0,6           | 1,3 | 1,6 | 1,2  | 1,4      | 0,2 |
| 2,5 mg/kg   | 1,5 mg/kg | 1,5           | 1,4 | 1,1 | 1,0  | 1,2      | 0,2 |
| 5 mg/kg     | 2,5 mg/kg | 5,1           | 4,7 | 1,4 | 6,6  | 4,5      | 2,2 |
| 10 mg/kg    | 5 mg/kg   | 6,5           | 4,5 | 5,8 | 13,6 | 7,6      | 4,1 |
| 20 mg/kg    | 10 mg/kg  | 3,7           | 4,1 | 9,1 | 2,6  | 4,9      | 2,9 |

Tabla 53: Pérdida de sangre en relación con la segunda gasa de control para animales tratados con Reopro™ en función de la dosis final (DE = desviación estándar)

| Reopro      |           | ID de babuino |      |      |          |    |
|-------------|-----------|---------------|------|------|----------|----|
| Dosis final | Dosis     | 13            | 14   | 15   | Promedio | DE |
| 20 µg/kg    | 20 µg/kg  | 2,7           | 0,6  | 2,1  | 1,8      | 1  |
| 70 µg/kg    | 50 µg/kg  | 1,2           | 2,1  | 0,4  | 1,2      | 1  |
| 170 µg/kg   | 100 µg/kg | 1,2           | 6,0  | 4,7  | 4,0      | 2  |
| 420 µg/kg   | 250 µg/kg | 28,3          | 7,1  | 13,9 | 16,4     | 11 |
| 920 µg/kg   | 500 µg/kg | 39,8          | 14,5 | 6,3  | 20,2     | 17 |

Tabla 54 Pérdida de sangre en relación con la segunda gasa de control para animales tratados con ALX-0081 en función de la dosis final (DE = desviación estándar)

| ALX-0081    |          | ID de babuino |     |     |     |     |     |      |     |          |     |
|-------------|----------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----------|-----|
| Dosis final | Dosis    | 17            | 18  | 19  | 20  | 21  | 22  | 23   | 24  | Promedio | DE  |
| 3 µg/kg     | 3 µ/kg   | ND            | ND  | 0,4 | 1,2 | 0,5 | 1,1 | 1,8  | 0,8 | 1,0      | 0,5 |
| 13 µg/kg    | 10 µ/kg  | 1,2           | 0,8 | 0,1 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,1  | 1,1 | 1,0      | 0,4 |
| 43 µg/kg    | 30 µ/kg  | 2,8           | 2,0 | 4,1 | 3,9 | 2,1 | 3,8 | 3,0  | 1,6 | 2,9      | 1,0 |
| 133 µg/kg   | 90 µ/kg  | 2,5           | 3,1 | 2,0 | 0,4 | 4,0 | 5,3 | 5,6  | 1,4 | 3,0      | 1,8 |
| 403 µg/kg   | 270 µ/kg | 2,6           | 2,3 | 2,3 | 0,4 | 0,8 | 5,6 | 10,7 | 0,9 | 3,2      | 3,4 |

Tabla 55: El promedio de la cantidad total de pérdida de sangre (= suma de pérdida de sangre de las primeras cinco dosis de compuesto de prueba) en relación con la segunda gasa de control

| Compuesto de prueba | Dosis total como múltiplo de la dosis eficaz | Promedio de pérdida de sangre total | Desviación estándar de pérdida de sangre |
|---------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|
|---------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|



|          |     |      |     |
|----------|-----|------|-----|
| Plavix   | 4   | 19,4 | 4,0 |
| Reopro   | 3,5 | 44   | 26  |
| ALX-0081 | 13  | 10,8 | 5,7 |

Tabla 56: Pérdida de sangre en gasas en relación con la segunda gasa de control para cada babuino tratado con Aspegic, heparina, Plavix y ALX-0081 en función de la dosis de fármaco. La dosis de fármaco eficaz en la que se observó una inhibición completa de CFR se indica en amarillo

|                                                       | 4    | 5    | 6   | 7    | 8   | 9   | 10  | mediana±DE |
|-------------------------------------------------------|------|------|-----|------|-----|-----|-----|------------|
| Aspegic 5 mg/kg + Heparina 60 UI/kg + Plavix 1 mg/kg  | 2,6  | 1    | 4,6 | 12,1 | 1,3 | 1,4 | 1,8 | 1,8 ± 3,5  |
| + Plavix 1 mg/kg                                      | 3,7  | 13,9 | 4,8 | 13,1 | 1,4 | 4,3 | 5,6 | 4,8 ± 6,7  |
| Epinefrina + dosis no eficaces de ALX-0081 + heparina | 9,4  | 2,7  | 2,7 | 67   | 0,3 | 4,8 | 9,2 | 4,8 ± 13,7 |
| Epinefrina + dosis eficaz de ALX-0081                 | 23,4 | 2,0  | 1   | 39,4 | 1,3 | 4,5 | 0,8 | 2,0 ± 10,3 |

Tabla 57: % de agregación plaquetaria inducida por ristocetina para cada babuino tratado con Aspegic, heparina, Plavix y ALX-0081 en función de la dosis de fármaco

|                                                      | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
|------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| control                                              | 75 | 78 | 79 | 70 | 46 | 70 | 46 |
| solución salina                                      | 48 | 78 | 74 | 24 | 45 | 65 | 47 |
| Aspegic 5 mg/kg + heparina 60 UI/kg Plavix + 1 mg/kg | 62 | 65 | 89 | 64 | 66 | 68 | 55 |
| + Plavix 1 mg/kg                                     | 42 | 63 | 66 | 83 | 59 | 76 | 60 |
| epinefrina + dosis eficaz de ALX-0081                | 0  | 24 | 24 | 6  | 17 | 7  | 8  |

Tabla 58: Concentración de ALX-0081 [µg/ml] en muestras de sangre obtenidas a los 10 minutos tras la administración

| ALX-0081    |           | ID de babuino |      |      |       |      |      |      |       |       |
|-------------|-----------|---------------|------|------|-------|------|------|------|-------|-------|
| Dosis final | Dosis     | 16            | 17   | 18   | 19    | 20   | 21   | 22   | 23    | 24    |
| 3 µg/kg     | 3 µg/kg   | 0,10          |      |      | 0,03  | 0,05 | 0,08 | 0,04 | 0,14  | 0,08  |
| 13 µg/kg    | 10 µg/kg  | 1,23          | 0,34 | 0,29 | 0,26  | 0,50 | 0,39 | 0,41 | 0,18  | 0,42  |
| 43 µg/kg    | 30 µg/kg  | 1,00          | 0,51 | 0,72 | 1,14  | 1,01 | 0,61 | 1,01 | 0,87  | 1,21  |
| 133 µg/kg   | 90 µg/kg  | 1,87          | 1,38 | 1,77 | 1,61  | 2,64 | 1,60 | 6,77 | 2,75  | 5,01  |
| 403 µg/kg   | 270 µg/kg | 6,77          | 4,03 | 6,73 | 35,14 | 7,66 | 6,01 | 9,24 | 18,56 | 16,62 |

Tabla 59: Duración de CFR [segundos] para babuinos tratados con ALX-0081 y con vWF

|                                   | ID de babuino |       |       |
|-----------------------------------|---------------|-------|-------|
| Dosis                             | 1             | 2     | 3     |
| Control                           | 119           | 140   | 111   |
| Solución salina                   | ND            | 158   | 158   |
| ALX-0081 30 µg/kg + 45 µg/kg/hora | >1800         | >1800 | >1800 |
| 250 UI de vWF                     | >420          | >1800 | >1800 |
| 250 UI de vWF                     | 246           | 256   | 230   |

Tabla 60: Volúmenes [µl] para preparar las diferentes mezclas para el estudio de la escisión de A1A2A3 por ADAMTS13

|                           | NPP  | NPP + EDTA | NPP + ALX-0081 | PBS  |
|---------------------------|------|------------|----------------|------|
| Tris (100 mM)             | 5    | 5          | 5              | 5    |
| BaCl <sub>2</sub> (10 mM) | 5    | 5          | 5              | 5    |
| Pefablock (100 mM)        | 1,3  | 1,3        | 1,3            | 1,3  |
| Plasma                    | 3,3  | 3,3        | 3,3            | 3,3  |
| ALX 0081 (2,48 mg/ml)     | -    | -          | 4              | -    |
| PBS                       | -    | -          | -              | 4    |
| EDTA (0,35 M) pH = 8,3    | -    | 2,6        | -              | -    |
| H <sub>2</sub> O          | 81,9 | 79,3       | 77,9           | 77,9 |
| A1A2A3 (460 µg/ml)        | 3,5  | 3,5        | 3,5            | 3,5  |

## LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Ablynx N.V.
- <120> Nanobodies mejorados para el tratamiento de trastornos mediados por agregación
- <130> P05-003 PCT
- 10 <160> 303
- <170> PatentIn versión 3.4
- 15 <210> 1  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Artificial
- 20 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)
- 25 <223> X = residuo distintivo (véase la tabla 2)
- <400> 1  
**Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Xaa Val Gln Ala Gly Gly**  
**1 5 10 15**
- Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly**  
**20 25**
- 30 <210> 2  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial
- 35 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(2)  
<223> X = Residuo distintivo
- 40 <220>  
<221> misc\_feature

<222> (9)..(9)  
 <223> X = Residuo distintivo

<220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> X = Residuo distintivo

<220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> X = Residuo distintivo

<400> 2  
 Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val Ala  
 15 1 5 10

<210> 3  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> X = Residuo distintivo

<220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(22)  
 <223> X = Residuo distintivo

<400> 3  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

<210> 4  
 <211> 11  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = Residuo distintivo

<220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Residuo distintivo

<220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> X = Residuo distintivo

<400> 4  
 Xaa Xaa Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

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

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 5  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

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

15 <210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 6  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala  
 25 1 5 10

<210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

35 <400> 7  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 13  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

45 <400> 8  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ala  
 1 5 10

<210> 9  
 50 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 9  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala  
 1 5 10

5 <210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 10  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala  
 1 5 10

15 <210> 11  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 11  
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ala  
 1 5 10

25 <210> 12  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 12  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

35 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

40 <210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

45 <400> 13  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

50 <210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

55 <400> 14

|    |                                                    |
|----|----------------------------------------------------|
|    | <b>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser</b> |
|    | <b>1 5 10</b>                                      |
|    | <210> 15                                           |
|    | <211> 5                                            |
| 5  | <212> PRT                                          |
|    | <213> Artificial                                   |
|    | <220>                                              |
|    | <223> Nanobody o fragmento de nanobody             |
| 10 | <400> 15                                           |
|    | <b>Asn Tyr Gly Met Gly</b>                         |
|    | <b>1 5</b>                                         |
|    | <210> 16                                           |
| 15 | <211> 5                                            |
|    | <212> PRT                                          |
|    | <213> Artificial                                   |
|    | <220>                                              |
| 20 | <223> Nanobody o fragmento de nanobody             |
|    | <400> 16                                           |
|    | <b>Ser Tyr Thr Leu Gly</b>                         |
|    | <b>1 5</b>                                         |
| 25 | <210> 17                                           |
|    | <211> 5                                            |
|    | <212> PRT                                          |
|    | <213> Artificial                                   |
| 30 | <220>                                              |
|    | <223> Nanobody o fragmento de nanobody             |
|    | <400> 17                                           |
|    | <b>Asn Tyr Asn Met Gly</b>                         |
|    | <b>1 5</b>                                         |
| 35 | <210> 18                                           |
|    | <211> 5                                            |
|    | <212> PRT                                          |
|    | <213> Artificial                                   |
| 40 | <220>                                              |
|    | <223> Nanobody o fragmento de nanobody             |
|    | <400> 18                                           |
|    | <b>Ser Ser Ala Met Ala</b>                         |
| 45 | <b>1 5</b>                                         |
|    | <210> 19                                           |
|    | <211> 5                                            |
|    | <212> PRT                                          |
| 50 | <213> Artificial                                   |
|    | <220>                                              |
|    | <223> Nanobody o fragmento de nanobody             |
| 55 | <400> 19                                           |
|    | <b>Tyr Tyr Asn Thr Gly</b>                         |
|    | <b>1 5</b>                                         |
|    | <210> 20                                           |
|    | <211> 5                                            |

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 20  
Ile Gly Ala Met Gly  
1 5

10 <210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 21  
Ile Gly Thr Met Gly  
1 5

20 <210> 22  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 22  
Tyr Asn Pro Met Gly  
30 1 5

<210> 23  
<211> 17  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

40 <400> 23  
Ser Ile Ser Trp Ser Gly Thr Tyr Thr Ala Tyr Ser Asp Asn Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 24  
<211> 17  
45 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

50 <400> 24  
Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 25  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 25  
 Thr Ser Ile Ser Trp Ser Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Asp Asn Val  
 1 5 10 15  
 10 Lys Gly  
 <210> 26  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 20 <400> 26  
 Ser Ile Ser Trp Ser Gly Met Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 27  
 <211> 16  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 30 <400> 27  
 Thr Ile Thr Ser Gly Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 28  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 28  
 Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 45 <210> 29  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody



<400> 29  
**Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly**  
**1 5 10 15**

5 <210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 30  
**Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly**  
**1 5 10 15**

15 <210> 31  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

25 <400> 31  
**Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu**  
**1 5 10 15**

**Gly**

30 <210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

35 <400> 32  
**Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu**  
**1 5 10 15**

**Gly**

40 <210> 33  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

45 <400> 33  
**Gln Ser Arg Tyr Arg Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala**  
**1 5 10 15**

**Tyr**

<210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 34  
 Leu Gly Arg Tyr Arg Ser Asn Trp Arg Asn Ile Gly Gln Tyr Asp Tyr  
 10 1 5 10 15  
 <210> 35  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 20 <400> 35  
 Gln Ser Arg Tyr Ser Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr  
 <210> 36  
 <211> 15  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 30 <400> 36  
 Ser Asn Arg Tyr Arg Thr His Thr Thr Gln Ala Met Tyr Asn Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 37  
 <211> 8  
 35 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 37  
 Val Val Asp Gly Lys Arg Ala Pro  
 1 5  
 45 <210> 38  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 38  
 Asn Arg Arg Gln Lys Thr Val Gln Met Gly Glu Arg Ala Tyr Asp Tyr  
 55 1 5 10 15  
 <210> 39  
 <211> 14

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 39  
**Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr**  
**1 5 10**

10 <210> 40  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 40  
**Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr**  
**1 5 10**

20 <210> 41  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 41  
**Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu**  
**1 5 10 15**

30 **Tyr Asn Phe**

<210> 42  
<211> 19  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

40 <400> 42  
**Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr Thr Phe**

<210> 43  
<211> 19  
45 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

50 <400> 43

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

Tyr Thr Phe

5 <210> 44  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 44  
Ser Phe Gly Met Ser  
1 5

15 <210> 45  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 45  
Leu Asn Leu Met Gly  
1 5

25 <210> 46  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 46  
Ile Asn Leu Leu Gly  
1 5

35 <210> 47  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 47  
Asn Tyr Trp Met Tyr  
1 5

45 <210> 48  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

55 <400> 48

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

Gly

<210> 49

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 49

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

<210> 50

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 50

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

<210> 51

25 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 51

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

Gly

35 <210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 52

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

45 <210> 53

<211> 17

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

5 <400> 53  
Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 54  
<211> 17  
10 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 54  
Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 55  
20 <211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 55  
Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 56  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 56  
Gly Gly Ser Leu Ser Arg  
1 5

40 <210> 57  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 57  
Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu  
50 1 5

<210> 58  
<211> 7

<212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 58  
 Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser  
 1 5

10 <210> 59  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 59  
 Gly Arg Gly Ser Pro  
 1 5

20 <210> 60  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

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

30 <210> 61  
 <211> 126

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

5 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 61

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

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

Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45  
Thr Ser Ile Ser Trp Ser Gly Thr Tyr Thr Ala Tyr Ser Asp Asn Val  
50 55 60

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

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

Ala Ala Gln Ser Arg Tyr Arg Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys  
100 105 110

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

10

<210> 62  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Artificial

15

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 62



# ES 2 694 247 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

<210> 63

<211> 126

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

10

<400> 63

# ES 2 694 247 T3

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

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

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

Val Gly Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Glu Phe  
50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Leu Gly Arg Tyr Arg Ser Asn Trp Arg Asn Ile Gly Gln  
100 105 110

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

<210> 64

<211> 126

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 64

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

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

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

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

# ES 2 694 247 T3

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

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

Ala Ala Gln Ser Arg Tyr Ser Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys  
100 105 110

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

<210> 65

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 65

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Ser  
20 25 30

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

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

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

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

Phe Val Val Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 66

15 <211> 125

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

# ES 2 694 247 T3

<400> 66

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Asn Arg Arg Gln Lys Thr Val Gln Met Gly Glu Arg Ala Tyr  
100 105 110

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

<210> 67

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 67

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 68  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 68  
Ala Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 69  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 69

# ES 2 694 247 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 70  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 70  
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 71  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 71  
Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 72  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 72  
Gln Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

# ES 2 694 247 T3

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Ser Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 73

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 73

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110



Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 74

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 74

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe  
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg  
165 170 175

Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro  
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
195 200 205

# ES 2 694 247 T3

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 75

<211> 265

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 75

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala

# ES 2 694 247 T3

145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys  
210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 76

<211> 286

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 76

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

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

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

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

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

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

# ES 2 694 247 T3

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu  
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala  
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly  
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
225 230 235 240

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
275 280 285

<210> 77

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 77

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln  
115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
130 135 140

Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly  
145 150 155 160

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile  
165 170 175

Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe  
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn  
195 200 205

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu  
210 215 220

Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
245

<210> 78

<211> 253

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

10

# ES 2 694 247 T3

<400> 78

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

<210> 79  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 79  
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly  
 20 25 30  
 Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr  
 85 90 95  
 Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala  
 165 170 175  
 Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala  
 180 185 190  
 Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser  
 195 200 205  
 Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 210 215 220

10

# ES 2 694 247 T3

Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu  
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr  
245 250 255

Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
260 265 270

Ser Ser

<210> 80

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 80

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe



# ES 2 694 247 T3

145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg  
165 170 175

Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
180 185 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 81

<211> 265

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 81

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

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

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

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

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

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

# ES 2 694 247 T3

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys  
210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 82  
<211> 286  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 82  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

# ES 2 694 247 T3

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110  
 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu  
 165 170 175  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
 180 185 190  
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala  
 195 200 205  
 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly  
 210 215 220  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 245 250 255  
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 260 265 270  
 Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275 280 285

<210> 83

5 <400> 83

000

<210> 84  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

10 <400> 84  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 1 5

15 <210> 85  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 85  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 20 25 30

25 <210> 86  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 86  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

<210> 87  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 87  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

<210> 88  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 88  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

# ES 2 694 247 T3

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

<210> 89

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 89

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

<210> 90

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 90

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 91

15 <211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 91

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

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

# ES 2 694 247 T3

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 92

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 92

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125



<210> 93  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 93  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Asn  
 20 25 30  
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110  
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

10

<210> 94  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 94  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Asn  
 20 25 30  
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

20

# ES 2 694 247 T3

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 95  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 95  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 96  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

5

<400> 96

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 97

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

15

<400> 97

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

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

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

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

# ES 2 694 247 T3

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

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

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 98

<211> 259

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 98

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe  
145 150 155 160

# ES 2 694 247 T3

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg  
165 170 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro  
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 99

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 99

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro

# ES 2 694 247 T3

|    | 100   |                                  | 105 |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Ser   | Glu                              | Tyr | Thr | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Gln | Val | Thr | Val | Ser | Ser |  |
|    |       |                                  | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
|    | Ala   | Ala                              | Ala | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln |  |
|    |       | 130                              |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
|    | Pro   | Gly                              | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Arg | Thr | Phe |  |
|    | 145   |                                  |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
|    | Ser   | Tyr                              | Asn | Pro | Met | Gly | Trp | Phe | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Arg |  |
|    |       |                                  |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
|    | Glu   | Leu                              | Val | Ala | Ala | Ile | Ser | Arg | Thr | Gly | Gly | Ser | Thr | Tyr | Tyr | Pro |  |
|    |       |                                  |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|    | Asp   | Ser                              | Val | Glu | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Arg |  |
|    |       |                                  | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|    | Ser   | Val                              | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |  |
|    |       | 210                              |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|    | Tyr   | Tyr                              | Cys | Ala | Ala | Ala | Gly | Val | Arg | Ala | Glu | Asp | Gly | Arg | Val | Arg |  |
|    | 225   |                                  |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|    | Thr   | Leu                              | Pro | Ser | Glu | Tyr | Thr | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Gln | Val | Thr |  |
|    |       |                                  |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|    | Val   | Ser                              | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <210> | 100                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <211> | 259                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 5  | <212> | PRT                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <213> | Artificial                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <220> |                                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 10 | <223> | Nanobody o fragmento de nanobody |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <400> | 100                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | Glu   | Val                              | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |  |
|    | 1     |                                  |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
|    | Ser   | Leu                              | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Arg | Thr | Phe | Ser | Tyr | Asn |  |
|    |       |                                  |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
|    | Pro   | Met                              | Gly | Trp | Phe | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Arg | Glu | Val | Val |  |
|    |       | 35                               |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |

# ES 2 694 247 T3

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe  
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg  
165 170 175

Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
180 185 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 101

<211> 265

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 101

# ES 2 694 247 T3

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



<210> 102  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 10 <400> 102  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn  
 20 25 30  
  
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
  
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110  
  
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
 130 135 140  
  
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
 145 150 155 160  
  
 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
 165 170 175  
  
 Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
 180 185 190  
  
 Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 195 200 205

# ES 2 694 247 T3

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 103

<211> 265

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 103

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
145 150 155 160

# ES 2 694 247 T3

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 104

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 104

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro

# ES 2 694 247 T3

|    | 100   |                                  | 105 |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Ser   | Glu                              | Tyr | Thr | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Gln | Val | Thr | Val | Ser | Ser |  |
|    |       |                                  | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
|    | Gly   | Gly                              | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |  |
|    |       | 130                              |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
|    | Gly   | Gly                              | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Val |  |
|    | 145   |                                  |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
|    | Gln   | Leu                              | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu |  |
|    |       |                                  |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
|    | Arg   | Leu                              | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Arg | Thr | Phe | Ser | Tyr | Asn | Pro | Met |  |
|    |       |                                  |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|    | Gly   | Trp                              | Phe | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Arg | Glu | Leu | Val | Ala | Ala |  |
|    |       |                                  | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|    | Ile   | Ser                              | Arg | Thr | Gly | Gly | Ser | Thr | Tyr | Tyr | Pro | Asp | Ser | Val | Glu | Gly |  |
|    | 210   |                                  |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|    | Arg   | Phe                              | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Arg | Met | Val | Tyr | Leu | Gln |  |
|    | 225   |                                  |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|    | Met   | Asn                              | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Ala |  |
|    |       |                                  |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|    | Ala   | Gly                              | Val | Arg | Ala | Glu | Asp | Gly | Arg | Val | Arg | Thr | Leu | Pro | Ser | Glu |  |
|    |       |                                  |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
|    | Tyr   | Thr                              | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Gln | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |  |
|    |       |                                  | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| 5  | <210> | 105                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <211> | 286                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <212> | PRT                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <213> | Artificial                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 10 | <220> |                                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <223> | Nanobody o fragmento de nanobody |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <400> | 105                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | Glu   | Val                              | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |  |
|    | 1     |                                  |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
|    | Ser   | Leu                              | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Arg | Thr | Phe | Ser | Tyr | Asn |  |
|    |       |                                  |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |

# ES 2 694 247 T3

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110  
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 165 170 175  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
 180 185 190  
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala  
 195 200 205  
 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly  
 210 215 220  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 245 250 255  
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 260 265 270  
 Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275 280 285

<210> 106

<211> 286  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 106  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn  
 20 25 30  
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110  
 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 165 170 175  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
 180 185 190  
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala  
 195 200 205  
 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly  
 210 215 220

# ES 2 694 247 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
275 280 285

<210> 107

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 107

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp Leu Asn  
20 25 30

Leu Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val  
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu His Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Lys Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 108

15 <211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

# ES 2 694 247 T3

<400> 108

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Trp Asp Ile Asn  
20 25 30

Leu Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val  
35 40 45

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

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

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

Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 109

5 <211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 109

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

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

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

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

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



# ES 2 694 247 T3

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 110

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 110

Ala Val Gln Leu Val Asp 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 Ser Phe Gly Ser Phe  
20 25 30

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

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

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

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

Thr Ile Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 111

15 <211> 114

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 111

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

# ES 2 694 247 T3

|                  |                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1                |                                        | 5   |     | 10  |     | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser              | Leu                                    | Arg | Leu | Thr | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Arg | Ser | Phe |
|                  |                                        |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly              | Met                                    | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Asp | Gln | Glu | Trp | Val |
|                  |                                        | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser              | Ala                                    | Ile | Ser | Ala | Asp | Ser | Ser | Thr | Lys | Asn | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val |
|                  | 50                                     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys              | Gly                                    | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Lys | Met | Leu | Tyr |
| 65               |                                        |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Leu              | Glu                                    | Met | Asn | Ser | Leu | Lys | Pro | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|                  |                                        |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Val              | Ile                                    | Gly | Arg | Gly | Ser | Pro | Ser | Ser | Pro | Gly | Thr | Gln | Val | Thr | Val |
|                  |                                        |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ser Ser          |                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> 112        |                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 114        |                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 5                | <212> PRT                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> Artificial |                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>            |                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 10               | <223> Nanobody o fragmento de nanobody |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 112        |                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln              | Val                                    | Gln | Leu | Ala | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |
| 1                |                                        |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser              | Leu                                    | Arg | Leu | Thr | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Gly | Ser | Phe |
|                  |                                        |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly              | Met                                    | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Glu | Gly | Leu | Glu | Trp | Val |
|                  |                                        | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser              | Ala                                    | Ile | Ser | Ala | Asp | Ser | Ser | Asp | Lys | Arg | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val |
|                  | 50                                     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys              | Gly                                    | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Lys | Met | Leu | Tyr |
| 65               |                                        |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Leu              | Glu                                    | Met | Asn | Ser | Leu | Lys | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|                  |                                        |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

<210> 113

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 113

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Lys Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr  
100 105 110

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

<210> 114

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe

# ES 2 694 247 T3

20

25

30

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 115

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 115

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 116

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 116

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 117

15 <211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 117

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

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

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

# ES 2 694 247 T3

35 40 45

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 118  
<211> 115  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 118  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 119

<211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 119  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

10 <210> 120  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 120  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

20 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

# ES 2 694 247 T3

50

55

60

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 121

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 121

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 122

15 <211> 30

<212> PRT

<213> Artificial



<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 122

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

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

<210> 123

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 123

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

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

<210> 124

<211> 30

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

25 <400> 124

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

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

<210> 125

30 <211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 125

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

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

40 <210> 126

<211> 30

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 126

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

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

<210> 127

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 127

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ile Phe Ser  
20 25 30

<210> 128

<211> 30

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

25 <400> 128

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

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

<210> 129

30 <211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 129

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

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

40 <210> 130

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 130

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

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

5

<210> 131

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 131

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

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

15

<210> 132

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 132

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

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

<210> 133

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 133

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

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

<210> 134

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

45

<400> 134

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

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

5 <210> 135  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 135

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

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

15 <210> 136  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 136

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser  
20 25 30

25 <210> 137  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

35 <400> 137

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

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

40 <210> 138  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 138

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

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

<210> 139

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 139

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

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

<210> 140

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 140

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

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

<210> 141

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 141

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

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

<210> 142

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 142

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

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

<210> 143  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 143  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

<210> 144  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 144  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

<210> 145  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 145  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

<210> 146  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 146

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

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

<210> 147  
 <211> 30  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

10 <400> 147  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

<210> 148  
 15 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 148  
 Ile Gly Ala Met Gly  
 1 5

25 <210> 149  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 149  
 Asn Tyr Gly Met Gly  
 1 5

35 <210> 150  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 150  
 Tyr Asn Pro Met Gly  
 45 1 5

<210> 151  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 151  
**Ser Ser Tyr Thr Leu Gly**  
**1 5**

5 <210> 152  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 152  
**Asn Tyr Gly Met Gly**  
**1 5**

15 <210> 153  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

25 <400> 153  
**Ser Ser Ala Met Ala**  
**1 5**

30 <210> 154  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 154  
**Tyr Tyr Asn Thr Gly**  
**1 5**

40 <210> 155  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 155  
**Ile Gly Ala Met Gly**  
**1 5**

50 <210> 156  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 156  
**Ile Gly Ala Met Gly**  
**1 5**



5 <210> 157  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 10 <400> 157  
 Ile Gly Thr Met Gly  
 1 5  
  
 15 <210> 158  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 20  
 <400> 158  
 Ile Gly Thr Met Gly  
 1 5  
  
 25 <210> 159  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 30  
 <400> 159  
 Tyr Asn Pro Met Gly  
 1 5  
  
 35 <210> 160  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 <400> 160  
 Tyr Asn Pro Met Gly  
 1 5  
 45  
 <210> 161  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 <400> 161  
 Tyr Asn Pro Met Gly  
 55 1 5  
  
 <210> 162  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 60 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

5 <400> 162  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**

<210> 163  
 <211> 5  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 163  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**

<210> 164  
 20 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 164  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**

30 <210> 165  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 165  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**

40 <210> 166  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 166  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**

50 <210> 167  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

60 <400> 167

**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**  
 5 <210> 168  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 168  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**  
 15 <210> 169  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 169  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**  
 25 <210> 170  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 170  
**Tyr Asn Pro Met Gly**  
**1 5**  
 35 <210> 171  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 171  
**Ile Gly Ala Met Gly**  
**1 5**  
 45 <210> 172  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 55 <400> 172  
**Ile Gly Ala Met Gly**  
**1 5**  
 <210> 173  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 173  
**Ile Gly Ala Met Gly**  
 1 5

10 <210> 174  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 174  
**Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala**  
 1 5 10

20 <210> 175  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 175  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Thr**  
 30 1 5 10

<210> 176  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

40 <400> 176  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala**  
 1 5 10

<210> 177  
 <211> 14  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

50 <400> 177  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Gly**  
 1 5 10

<210> 178  
 <211> 14  
 55 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 60 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 178  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Thr**  
 1 5 10

5 <210> 179  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 179  
**Trp Tyr Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala**  
 1 5 10

15 <210> 180  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 180  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
 25 1 5 10

<210> 181  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

35 <400> 181  
**Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala**  
 1 5 10

<210> 182  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

45 <400> 182  
**Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala**  
 1 5 10

<210> 183  
 <211> 14  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 183  
**Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala**  
 1 5 10

<210> 184  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 184  
**Leu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala**  
 10 **1 5 10**  
 <210> 185  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 20 <400> 185  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala**  
**1 5 10**  
 <210> 186  
 <211> 14  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 30 <400> 186  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Asp Val Val Ala**  
**1 5 10**  
 <210> 187  
 <211> 14  
 35 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 187  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala**  
**1 5 10**  
 45 <210> 188  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 188  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val Ala**  
**1 5 10**  
 55 <210> 189  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 60 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 189  
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala  
5 1 5 10

<210> 190  
<211> 14  
<212> PRT  
10 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 190  
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val Ala  
1 5 10

<210> 191  
<211> 14  
20 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

25 <400> 191  
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Val Val Ala  
1 5 10

<210> 192  
30 <211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
35 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 192  
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala  
1 5 10

40 <210> 193  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 193  
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala  
50 1 5 10

<210> 194  
<211> 14  
<212> PRT  
55 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 194

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

5 <210> 195  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

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

15 <210> 196  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

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

25 <210> 197  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

**Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala**  
**1 5 10**

35 <210> 198  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

**Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala**  
**1 5 10**

45 <210> 199  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

**Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala**  
**1 5 10**

55 <210> 200  
 <211> 16



<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 200  
Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly  
1 5 10 15

10 <210> 201  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 201  
Ser Ile Ser Trp Ser Gly Thr Tyr Thr Ala Tyr Ser Asp Asn Val Lys  
1 5 10 15

Gly

20 <210> 202  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 202  
30 Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 203  
<211> 17  
35 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

40 <400> 203  
Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 204  
<211> 17  
45 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
50 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 204

Ser Ile Ser Trp Ser Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Asp Asn Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 205

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 205

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

<210> 206

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 206

Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 207

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 207

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

<210> 208

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 208

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

<210> 209

<211> 16

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 209  
**Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly**  
**1 5 10 15**

5 <210> 210  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 210  
**Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly**  
**1 5 10 15**

15 <210> 211  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 211  
**Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu**  
**1 5 10 15**

25 **Gly**

<210> 212  
 <211> 17  
 <212> PRT

30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

35 <400> 212  
**Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu**  
**1 5 10 15**

**Gly**

<210> 213  
 <211> 17  
 <212> PRT

40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

45 <400> 213  
**Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu**  
**1 5 10 15**

**Gly**

<210> 214  
 <211> 17

50

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

5 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 214

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

10 <210> 215

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 215

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

20 <210> 216

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 216

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

30 <210> 217

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

40 <400> 217

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 218

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 218

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

5

<210> 219

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 219

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

15

<210> 220

<211> 17

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

25

<400> 220

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 221

<211> 17

30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

35

<400> 221

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 222

40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 222

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 223

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

10

<400> 223

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 224

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 224

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly  
1 5 10 15

25 <210> 225

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 225

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly  
1 5 10 15

35

<210> 226

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 226

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

45

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
20 25 30

<210> 227

<211> 32

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

# ES 2 694 247 T3

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 227

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

5

<210> 228

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 228

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

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

15

<210> 229

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 229

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp His Ala Ala Asn Thr Val Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

25

<210> 230

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 230

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

35

<210> 231

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 231  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Asp Cys Asn Phe  
20 25 30

5 <210> 232  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 232  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

15 <210> 233  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 233  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
20 25 30

25 <210> 234  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 234  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
20 25 30

35 <210> 235  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

45 <400> 235



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

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
20 25 30

<210> 236

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 236

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

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
20 25 30

<210> 237

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 237

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

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

<210> 238

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 238

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

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

<210> 239

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 239

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 240  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 240  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 241  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 241  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 242  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 242  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 243  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 243

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 244

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 244

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 245

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 245

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 246

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 246

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 247

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 247

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

5 <210> 248  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 248  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

15 <210> 249  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 249  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
 20 25 30

25 <210> 250  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 250  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
 20 25 30

35 <210> 251  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

45 <400> 251

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala  
 20 25 30

<210> 252  
 <211> 14  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 10

<400> 252  
 Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 253  
 15 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 20 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 253  
 Gln Ser Arg Tyr Arg Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala  
 1 5 10 15

Tyr

25 <210> 254  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 254  
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Tyr Asn Phe

35 <210> 255  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 255  
 Leu Gly Arg Tyr Arg Ser Asn Trp Arg Asn Ile Gly Gln Tyr Asp Tyr  
 45 1 5 10 15

<210> 256  
 <211> 17  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

5 <400> 256  
**Gln Ser Arg Tyr Ser Ser Asn Tyr Tyr Asp His Asp Asp Lys Tyr Ala**  
**1 5 10 15**

**Tyr**

10 <210> 257  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 257  
**Val Val Asp Gly Lys Arg Ala Pro**  
**1 5**

20 <210> 258  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 258  
**Asn Arg Arg Gln Lys Thr Val Gln Met Gly Glu Arg Ala Tyr Asp Tyr**  
**1 5 10 15**

30 <210> 259  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 259  
**Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr**  
**1 5 10**

40 <210> 260  
 <211> 14  
 <212> PRT

45 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

50 <400> 260  
**Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 261  
 <211> 14  
 <212> PRT

55 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 261  
Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr  
5 1 5 10

<210> 262  
<211> 14  
<212> PRT  
10 <213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 262  
Asn Leu Lys Gln Gly Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr  
1 5 10

<210> 263  
<211> 19  
20 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

25 <400> 263  
Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Tyr Thr Phe

<210> 264  
30 <211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
35 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 264  
Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Ser Leu Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Tyr Thr Phe

40 <210> 265  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 265  
Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Tyr Thr Phe

50

<210> 266  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 266  
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 10 Tyr Asn Phe  
 <210> 267  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 20 <400> 267  
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Asn Phe  
 <210> 268  
 <211> 19  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 30 <400> 268  
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Asn Phe  
 <210> 269  
 <211> 19  
 35 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 <400> 269  
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Asn Phe  
 45 <210> 270  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial



<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

5 <400> 270  
**Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr Thr Phe**

<210> 271

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 271  
**Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr Thr Phe**

<210> 272

20 <211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 272  
**Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr Thr Phe**

30 <210> 273

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 273  
**Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr Thr Phe**

40 <210> 274

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 274

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
Tyr Thr Phe

5 <210> 275  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 275

Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr  
1 5 10

15 <210> 276  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 276

Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr  
1 5 10

25 <210> 277  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 277

Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr  
1 5 10

35 <210> 278  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 278

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

45 <210> 279  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 279

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

<210> 280  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 10 <400> 280  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10  
  
 <210> 281  
 <211> 11  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
 20  
 <400> 281  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10  
  
 <210> 282  
 25 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 <400> 282  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10  
  
 35 <210> 283  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 <400> 283  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10  
 45  
 <210> 284  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody  
  
 <400> 284  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 55 1 5 10  
  
 <210> 285  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 60 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

5 <400> 285  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

<210> 286  
 <211> 11  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

15 <400> 286  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

<210> 287  
 <211> 11  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

25 <400> 287  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

30 <210> 288  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 288  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

40 <210> 289  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 289  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

50 <210> 290  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

60 <400> 290

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

5 <210> 291  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 291  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

15 <210> 292  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 292  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

25 <210> 293  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 293  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

35 <210> 294  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 294  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 45 1 5 10

50 <210> 295  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

55 <400> 295  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 296  
 <211> 11

<212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 296  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

10 <210> 297  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 297  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

20 <210> 298  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 298  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

30 <210> 299  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

40 <400> 299  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

45 <210> 300  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 300  
**Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

55 <210> 301  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 301  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

5 <210> 302  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 302  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

15 <210> 303  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Nanobody o fragmento de nanobody

<400> 303  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 25 1 5 10

## REIVINDICACIONES

1. Proteína o polipéptido, que comprende dos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados, en el que dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados están dirigidos contra factor de von Willebrand (vWF), y dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados consisten en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:
  - i) CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos YNPMG [SEQ ID NO: 22];
  - y en el que:
  - ii) CDR2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:
 

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| AISRTGGSTYYPDSVEG | [SEQ ID NO: 32], y |
| AISRTGGSTYYARSVEG | [SEQ ID NO: 31];   |

  - y en el que:
  - iii) CDR3 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:
 

|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| AGVRAEDGRVRTLPSEYTF  | [SEQ ID NO: 42],   |
| AGVRAEDGRVRSPLPSEYTF | [SEQ ID NO: 43], y |
| AGVRAEDGRVRTLPSEYNF  | [SEQ ID NO: 41].   |
2. Proteína o polipéptido según la reivindicación 1, en el que:
  - i) CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos YNPMG [SEQ ID NO: 22];
  - y en el que:
  - ii) CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG [SEQ ID NO: 32];
  - y en el que:
  - iii) CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPSEYTF [SEQ ID NO: 42].
3. Proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados son  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados de clase KERE.
4. Proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados son variantes humanizadas de dichos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados.
5. Proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que los  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados presentes en la proteína o el polipéptido se eligen del grupo que consiste en los  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados 12B6 (SEQ ID NO: 62); 12A2 (SEQ ID NO: 71); 12F2 (SEQ ID NO: 72); 14H10 (SEQ ID NO: 73); 12B6H1 (SEQ ID NO: 86); 12B6H2 (SEQ ID NO: 87); 12B6H3 (SEQ ID NO: 88); 12B6H4 (SEQ ID NO: 89); 12A2H1 (SEQ ID NO: 90); 12A2H3 (SEQ ID NO: 91); 12A2H4 (SEQ ID NO: 92); 12A2H11 (SEQ ID NO: 93) y 12A2H13 (SEQ ID NO: 94).
6. Proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que los  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados presentes en la proteína o el polipéptido consisten en el  $V_{HH}$ , dominio  $V_{HH}$  humanizado o dominio  $V_H$  camelizado 12A2H1 (SEQ ID NO: 90).
7. Proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dichos dos  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$  humanizados o dominios  $V_H$  camelizados están directamente unidos entre sí o unidos entre sí por medio de un ligador, preferiblemente dicho ligador es una secuencia de aminoácidos, más preferiblemente dicho ligador comprende entre 1 y 40 residuos de aminoácido, tal como entre 2 y 30 residuos de aminoácido, preferiblemente en el que el ligador comprende o consiste esencialmente en residuos de glicina y serina; o en el que el ligador comprende o consiste esencialmente en residuos de alanina.



8. Proteína o polipéptido elegido del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74-76, SEQ ID NO: 80-82 y SEQ ID NO: 98-106, preferiblemente el polipéptido de SEQ ID NO: 98.
9. Proteína o el polipéptido que consiste en SEQ ID NO: 98.
10. Secuencia de nucleótidos o ácido nucleico, que codifica una proteína o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
11. Célula huésped, que comprende una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según la reivindicación 10, o que expresa o puede expresar una proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
12. Método para preparar una proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende cultivar o mantener una célula huésped según la reivindicación 11 en condiciones tales que dicha célula huésped produce o expresa una proteína o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9; y que opcionalmente además comprende aislar la proteína o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
13. Composición farmacéutica, que comprende al menos una proteína o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, o proteína o polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionado con la agregación mediada por plaquetas, elegido de trombo no oclusivo, la formación de un trombo oclusivo, formación de trombos arteriales, oclusión coronaria aguda, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis y trastornos que surgen de injerto de derivación coronaria, valvuloplastia de arterias coronarias e intervenciones coronarias tales como angioplastia, colocación de endoprótesis o aterectomía, hiperplasia tras angioplastia, aterectomía o colocación de endoprótesis arteriales, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de arterias enfermas, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), ataque isquémico cerebral transitorio y accidentes cerebrovasculares, angina de pecho estable o inestable, infarto cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomía carotídea, estenosis de arteria carótida, isquemia crítica de las extremidades, cardioembolia, enfermedad vascular periférica, reestenosis e infarto de miocardio y que contiene opcionalmente además una o más de otras sustancias activas para la prevención o el tratamiento de trastornos mediados por agregación, tales como aspirina (Aspegic), heparina, Plavix® y/o Reopro®.
15. Uso de una proteína o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionado con la agregación mediada por plaquetas, elegido de trombo no oclusivo, la formación de un trombo oclusivo, formación de trombos arteriales, oclusión coronaria aguda, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis y trastornos que surgen de injerto de derivación coronaria, valvuloplastia de arterias coronarias e intervenciones coronarias tales como angioplastia, colocación de endoprótesis o aterectomía, hiperplasia tras angioplastia, aterectomía o arterial colocación de endoprótesis, síndrome oclusivo en un sistema vascular o falta de permeabilidad de arterias enfermas, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), ataque isquémico cerebral transitorio y accidentes cerebrovasculares, angina de pecho estable o inestable, infarto cerebral, síndrome de HELLP, endarterectomía carotídea, estenosis de arteria carótida, isquemia crítica de las extremidades, cardioembolia, enfermedad vascular periférica, reestenosis e infarto de miocardio.

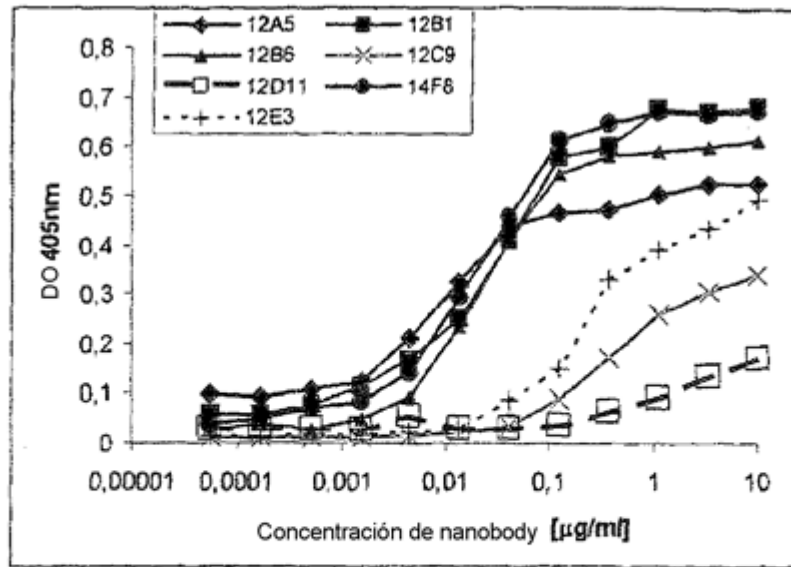


Figura 1

12A5 AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYAD  
 12B4 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGLYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYAD  
 12E8 AVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGLYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYAD  
 12A6 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYAD  
 12D8 AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGTMGLYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYAD

12A5 PVKGRFTISRDPKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS  
 12B4 SVKGRFTISRDPKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS  
 12E8 SVKGRFTISRDPKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS  
 12A6 SVKGRFTISRDPKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS  
 12D8 SVKGRFTISRDPKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS

Figura 2

12B6 QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTSYNPMGWFRQAPGKERDVVAISRTGGSTYYAR  
 12A2 QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTSYNPMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPD  
 12F2 QVKLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTSYNPMGWFRQAPGRERDVVAISRTGGSTYYPD  
 14H10 QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTSYNPMGWFRQAPGKERDVVAISRTGGSTYYPD

12B6 SVEGRFTISRDAKRMVYLQMNAIKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSYTFWGGGTQVTVSS  
 12A2 SVEGRFTISRDAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSYTFWGGGTQVTVSS  
 12F2 SVEGRFTISRDAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRSLSYTFWGGGTQVTVSS  
 14H10 SVEGRFTISRDAKRMVYLEMNNLKPDDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSYTFWGGGTQVTVSS

Figura 3

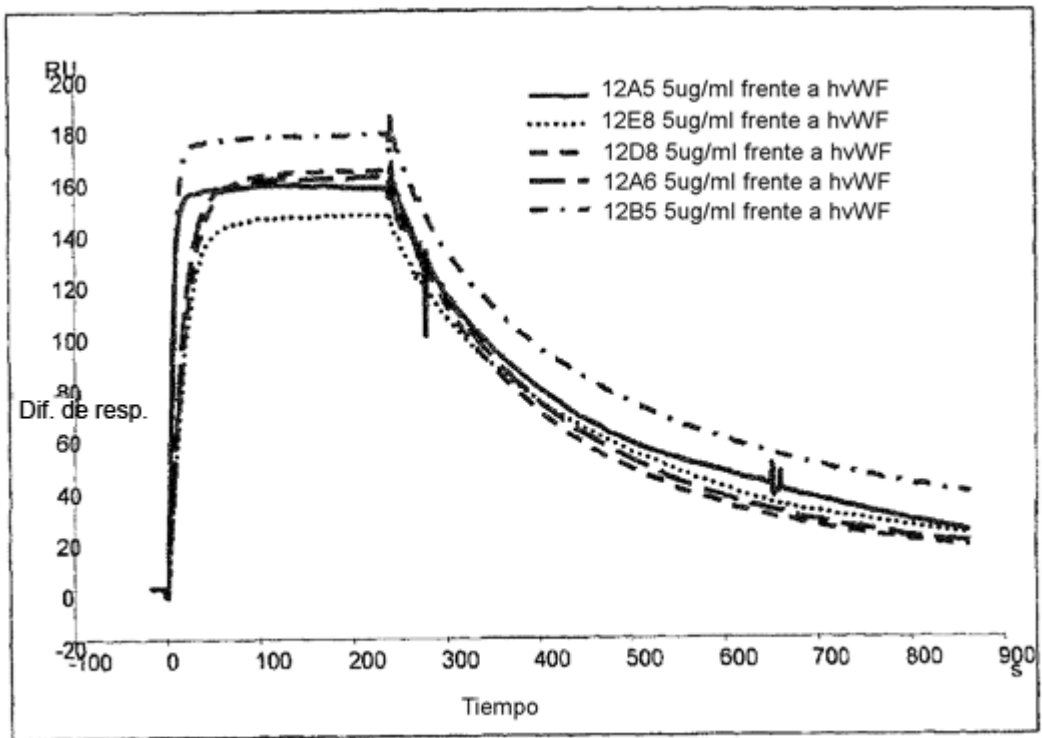


Figura 4

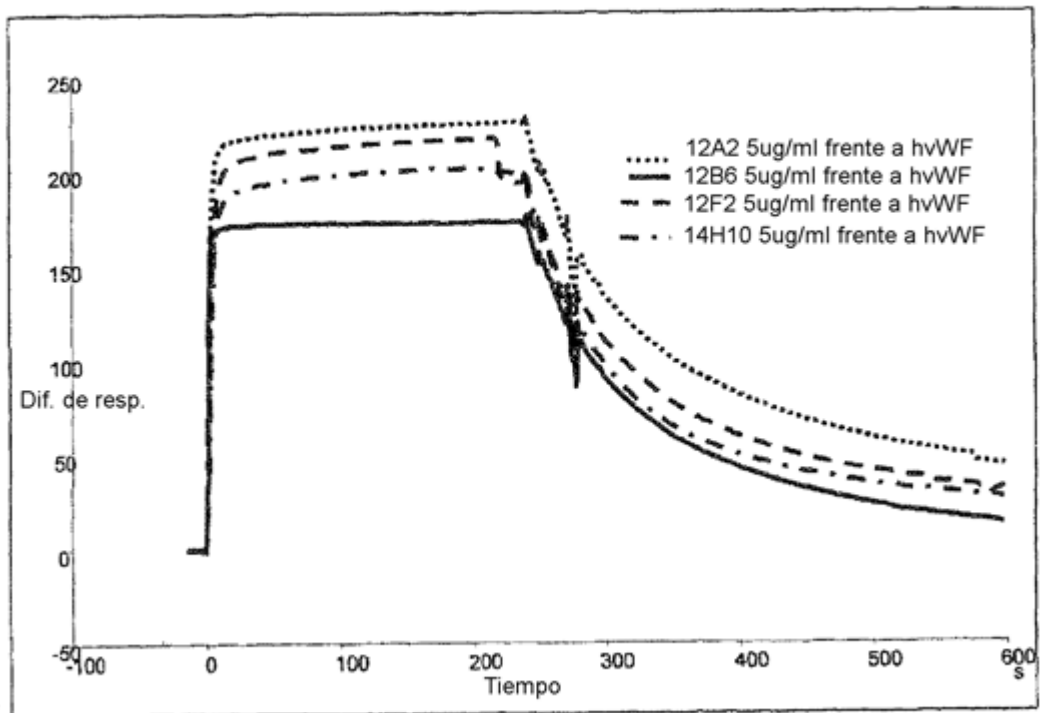


Figura 5

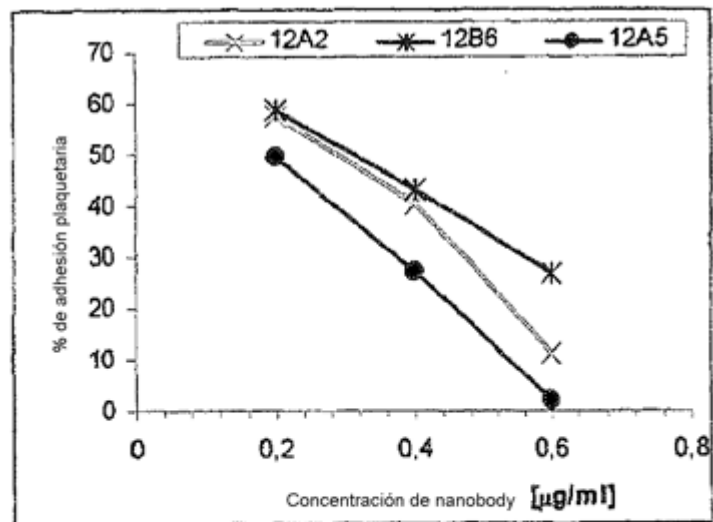


Figura 6

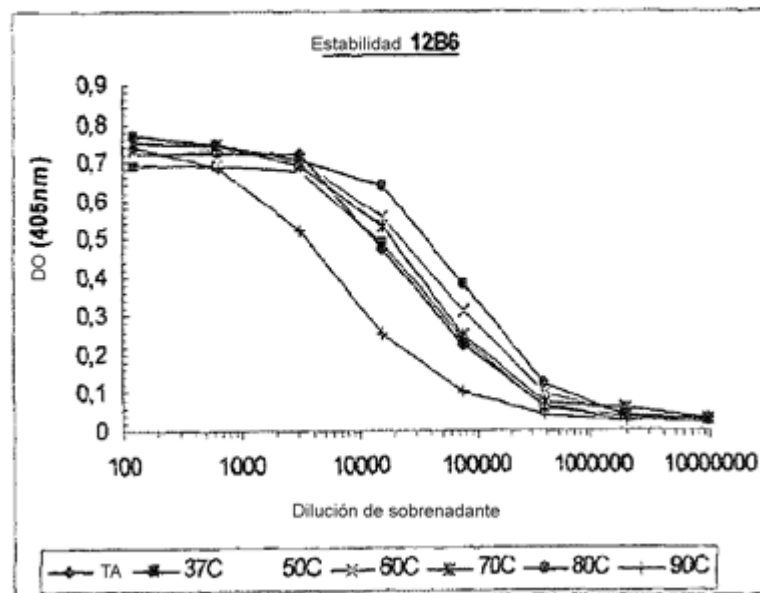


Figura 7a

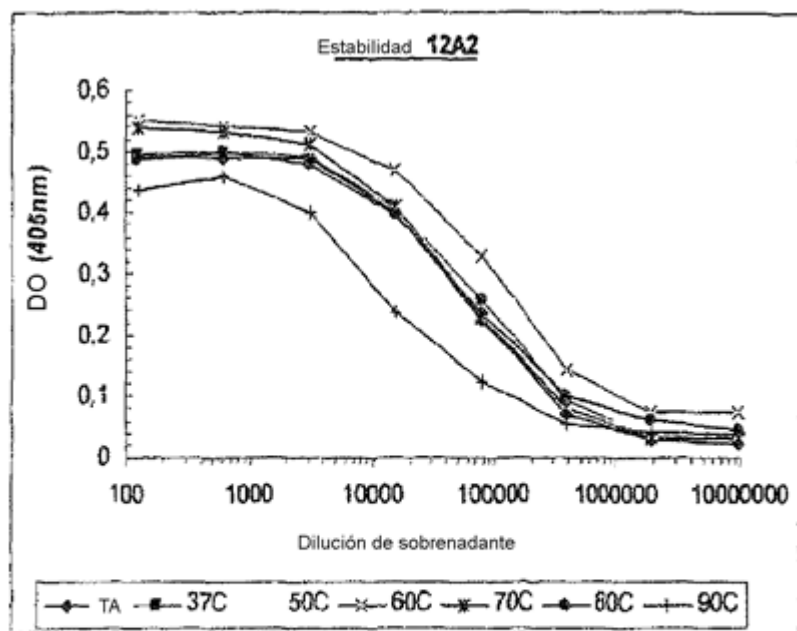


Figura 7b

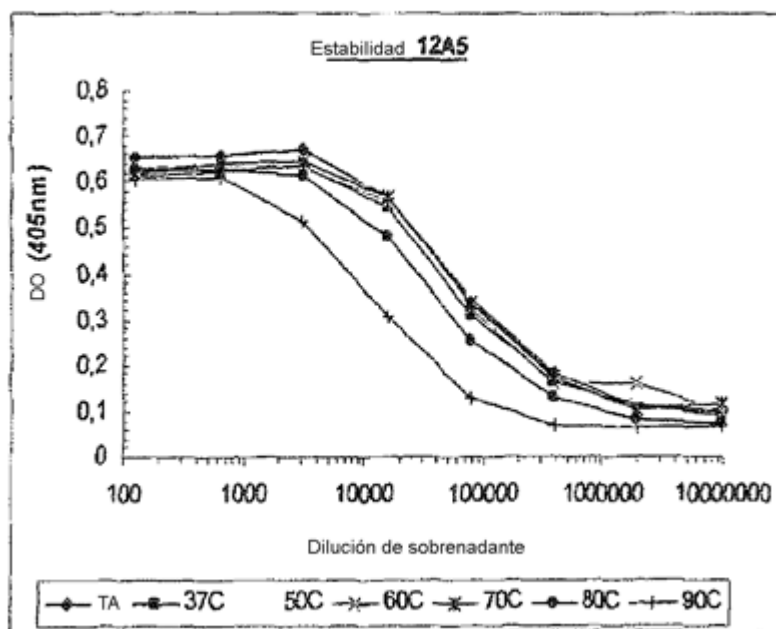


Figura 7c

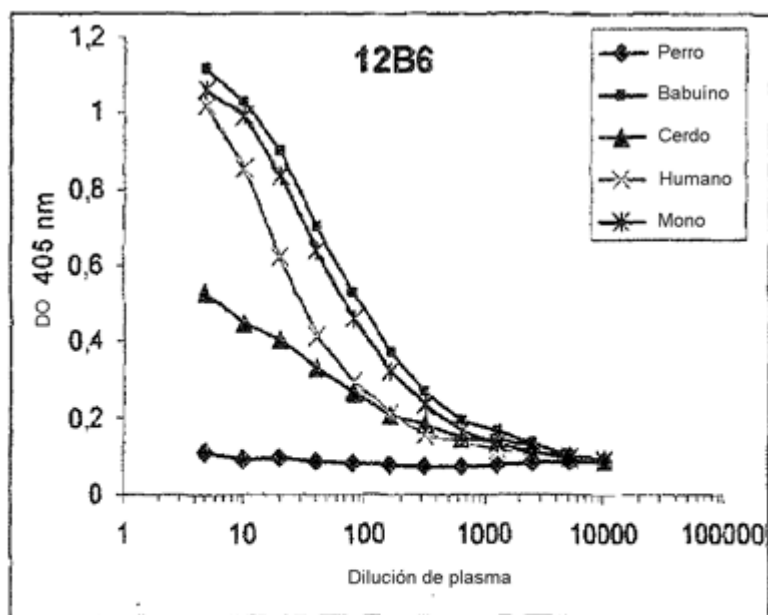


Figura 8a

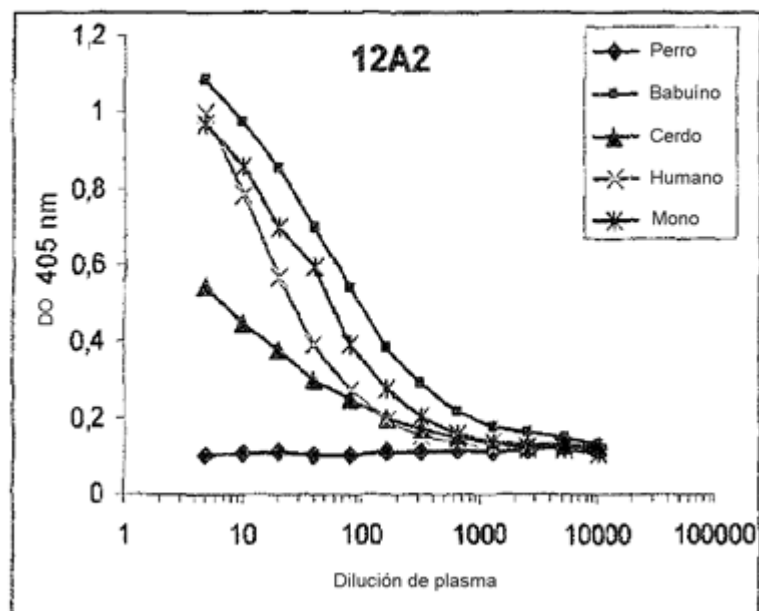


Figura 8b

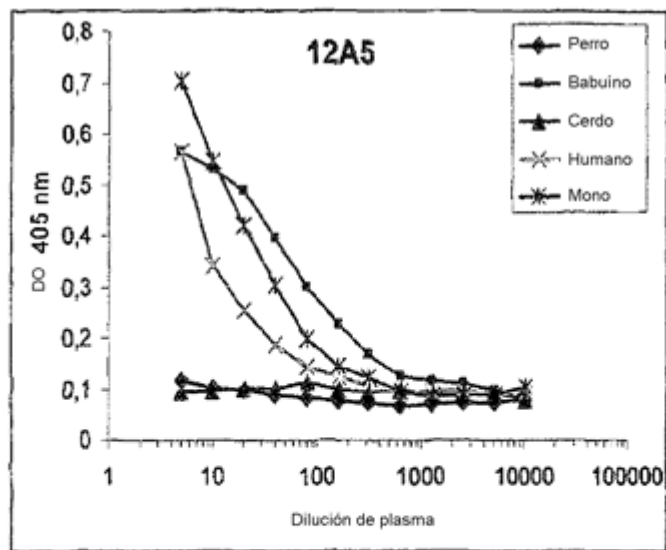


Figura 8c

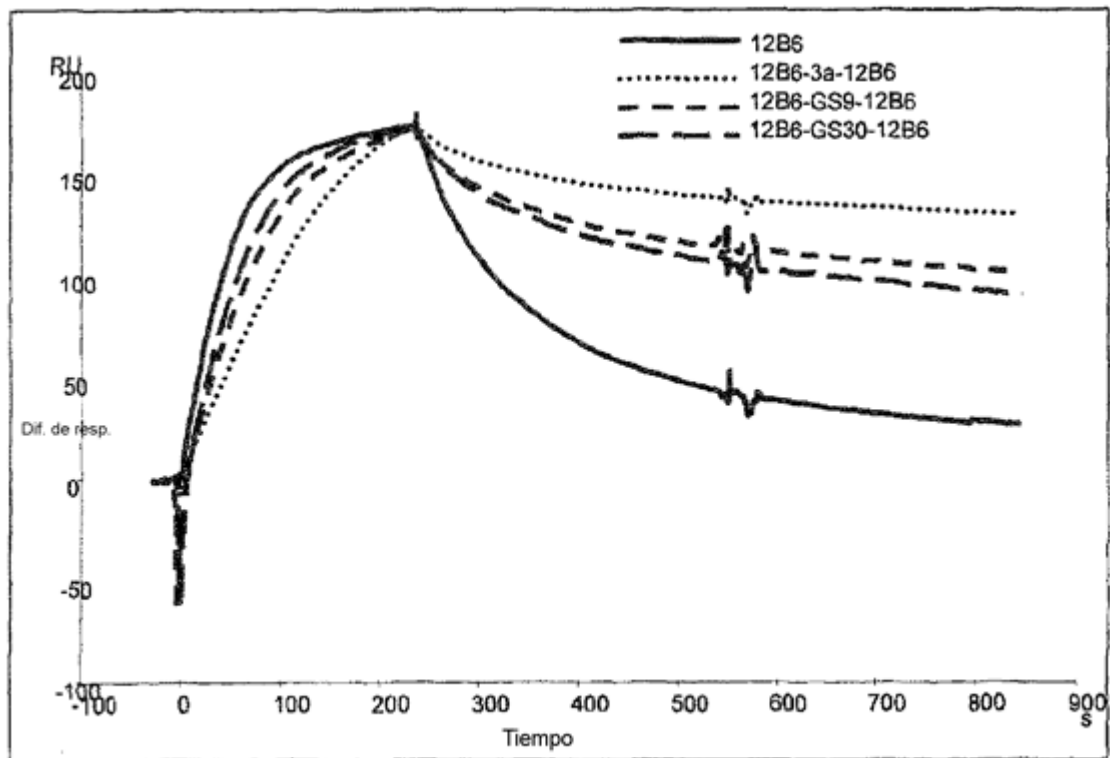


Figura 9

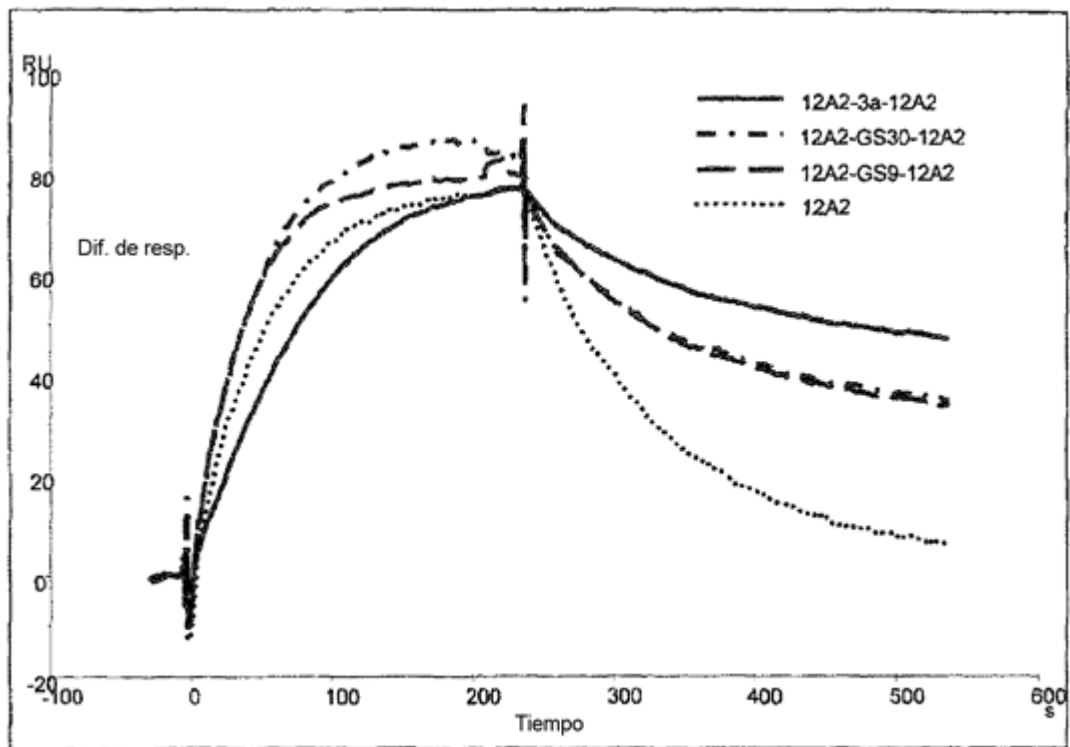


Figura 10

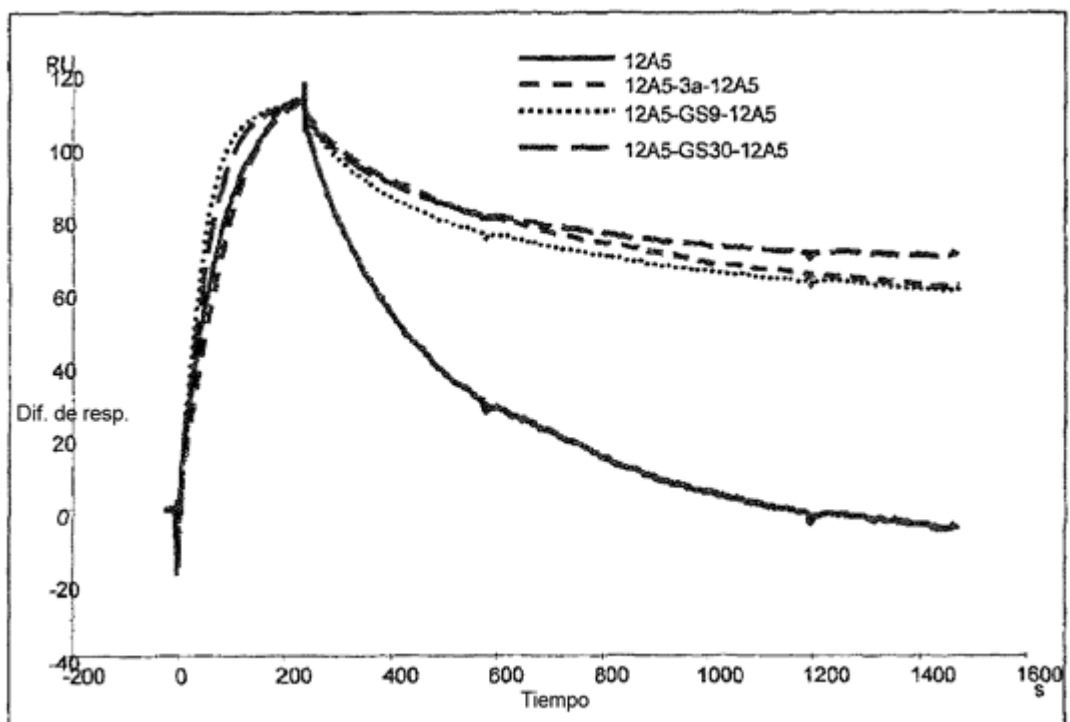


Figura 11



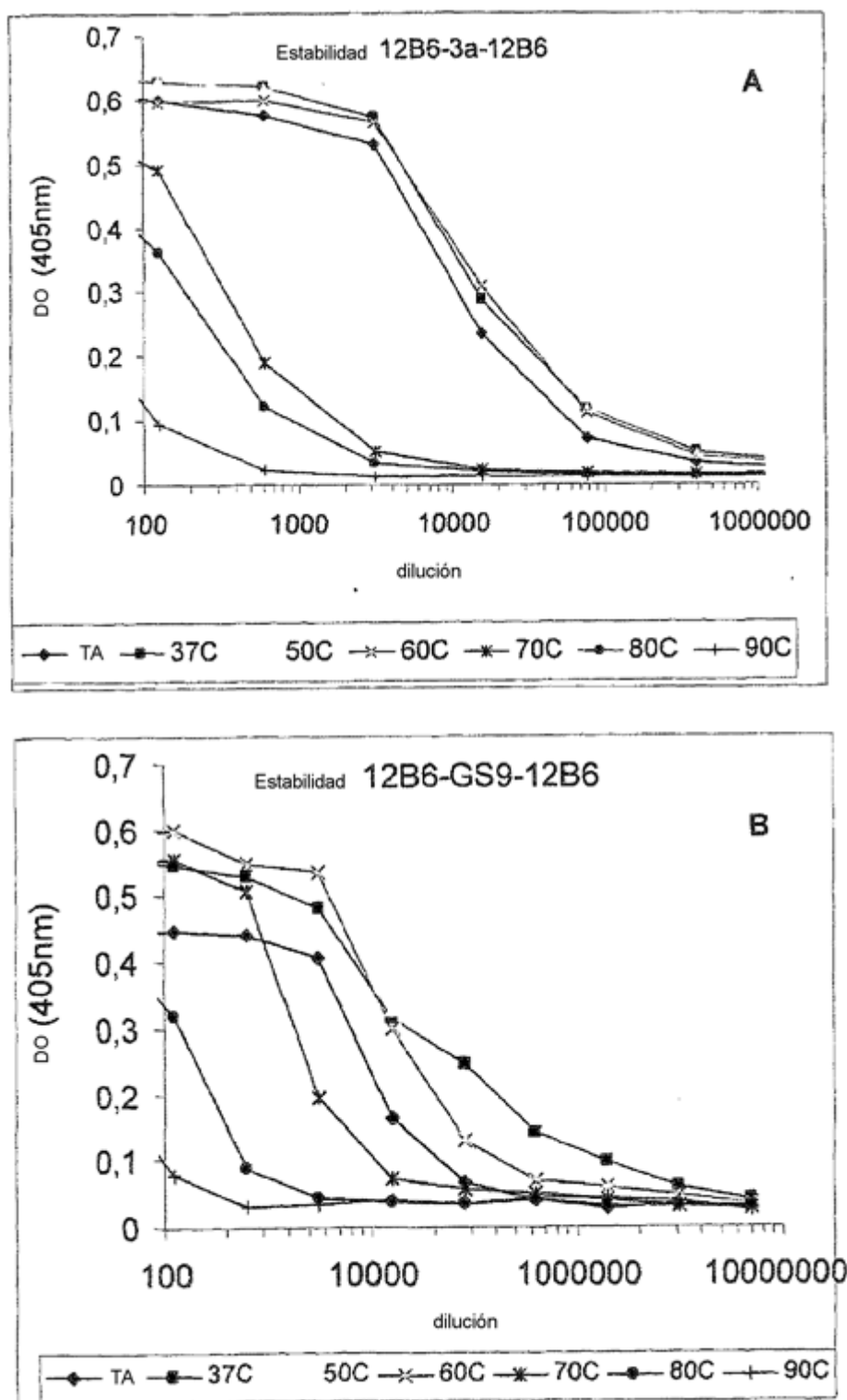


Figura 12-1

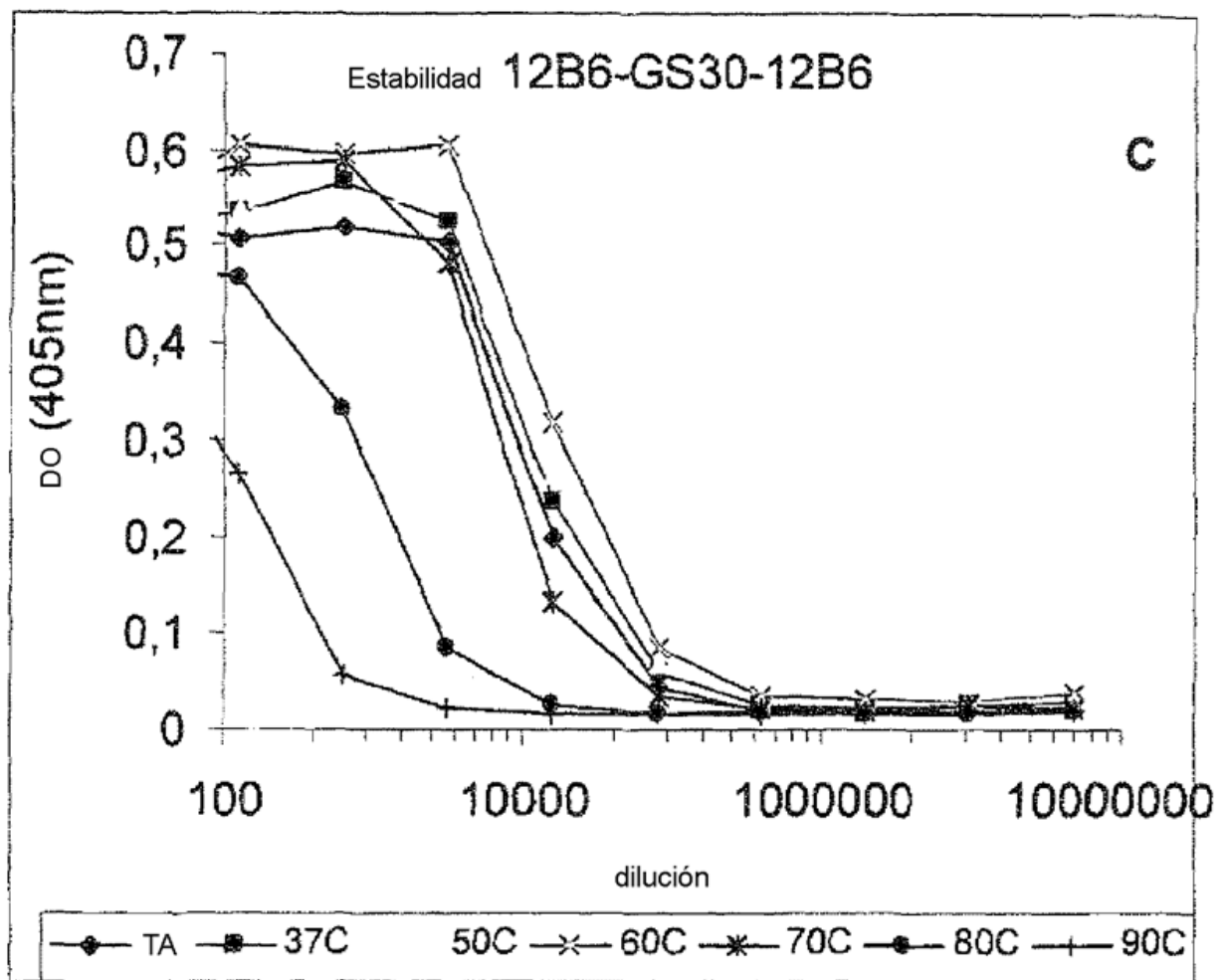


Figura 12-2

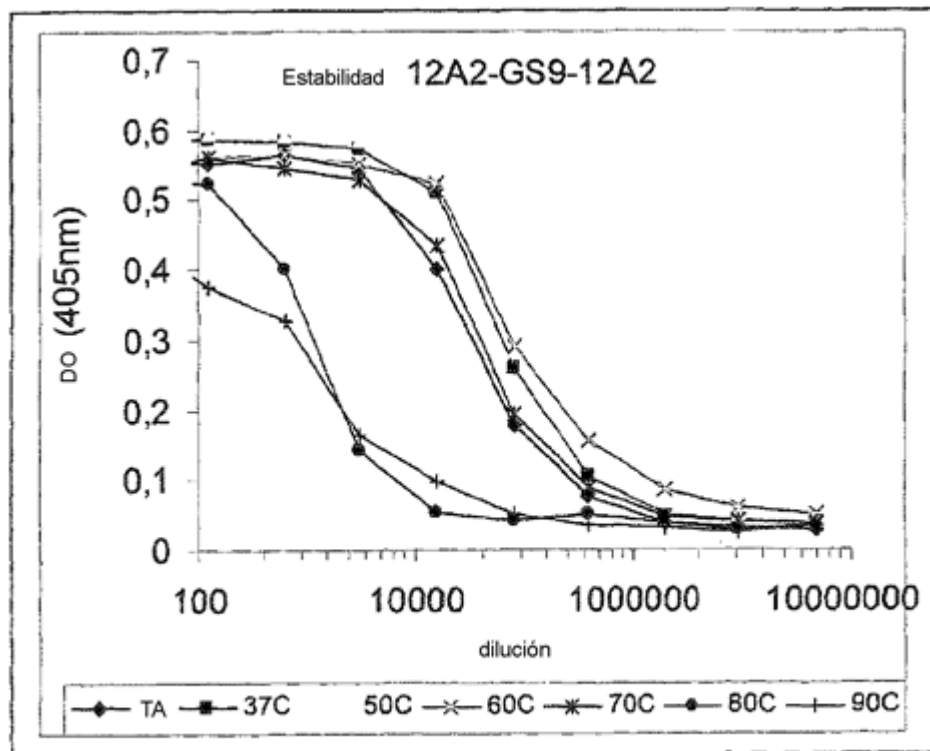
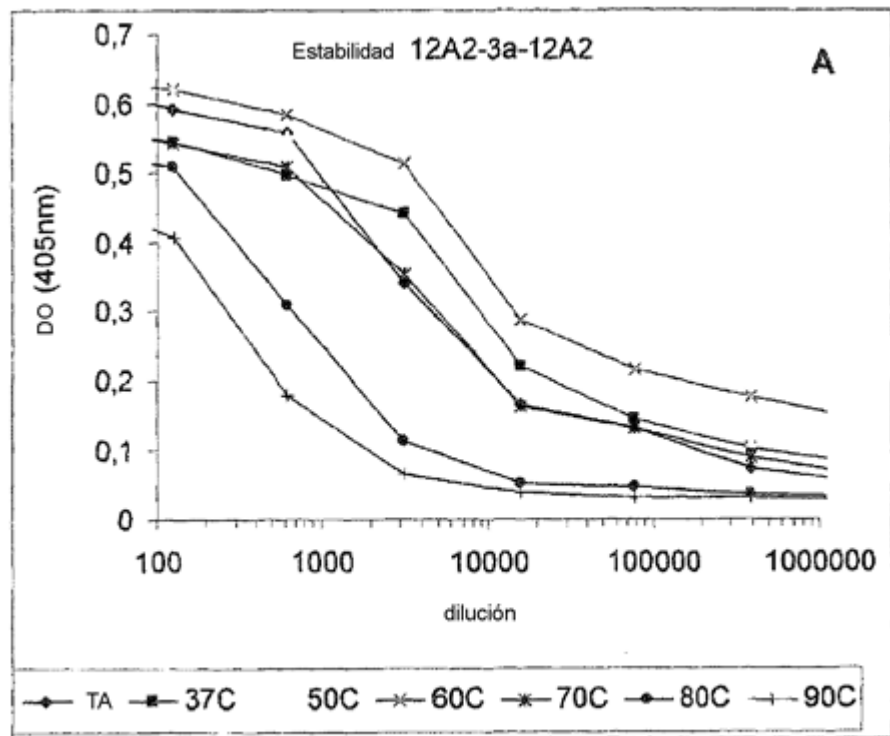


Figura 13-1

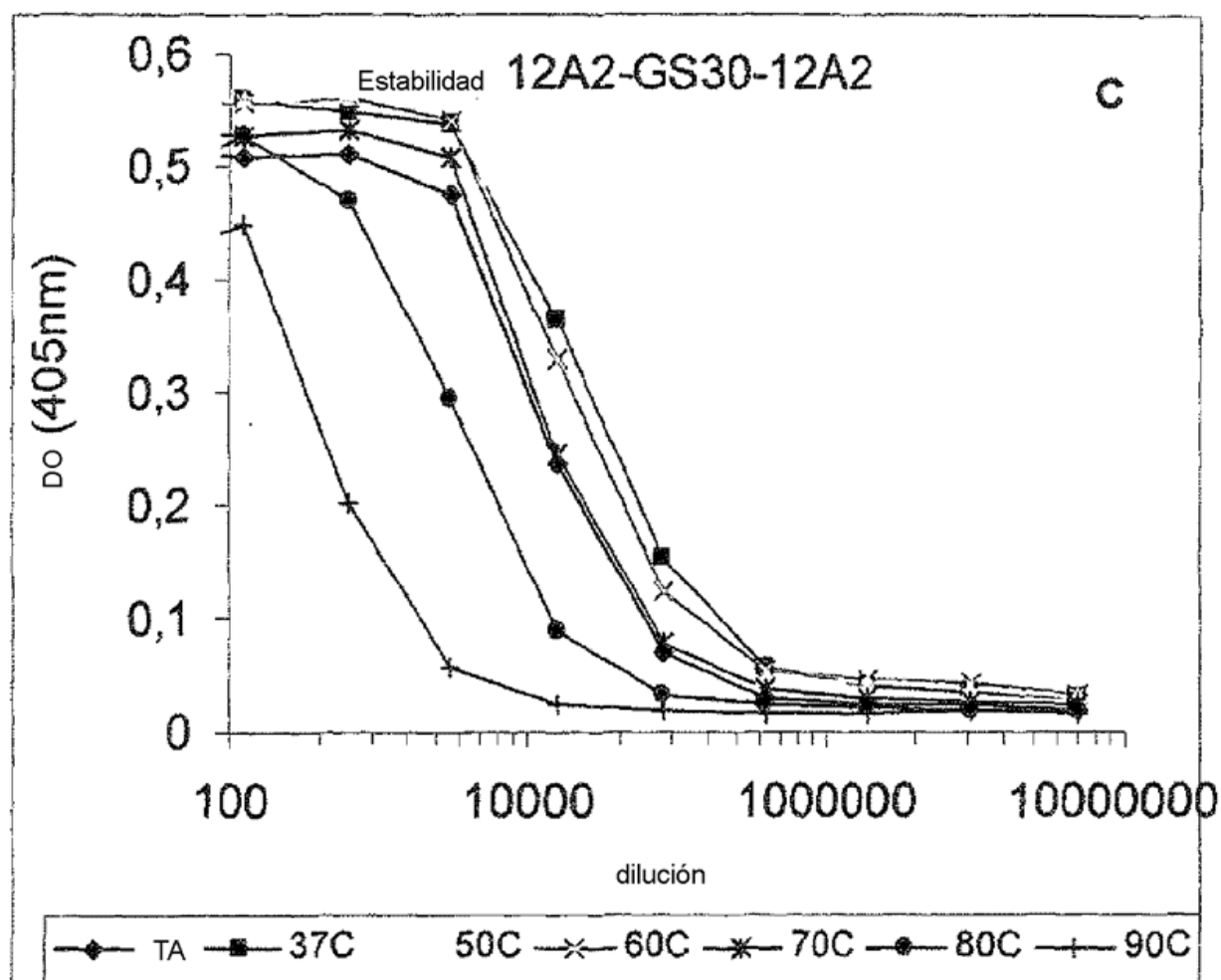


Figura 13-2

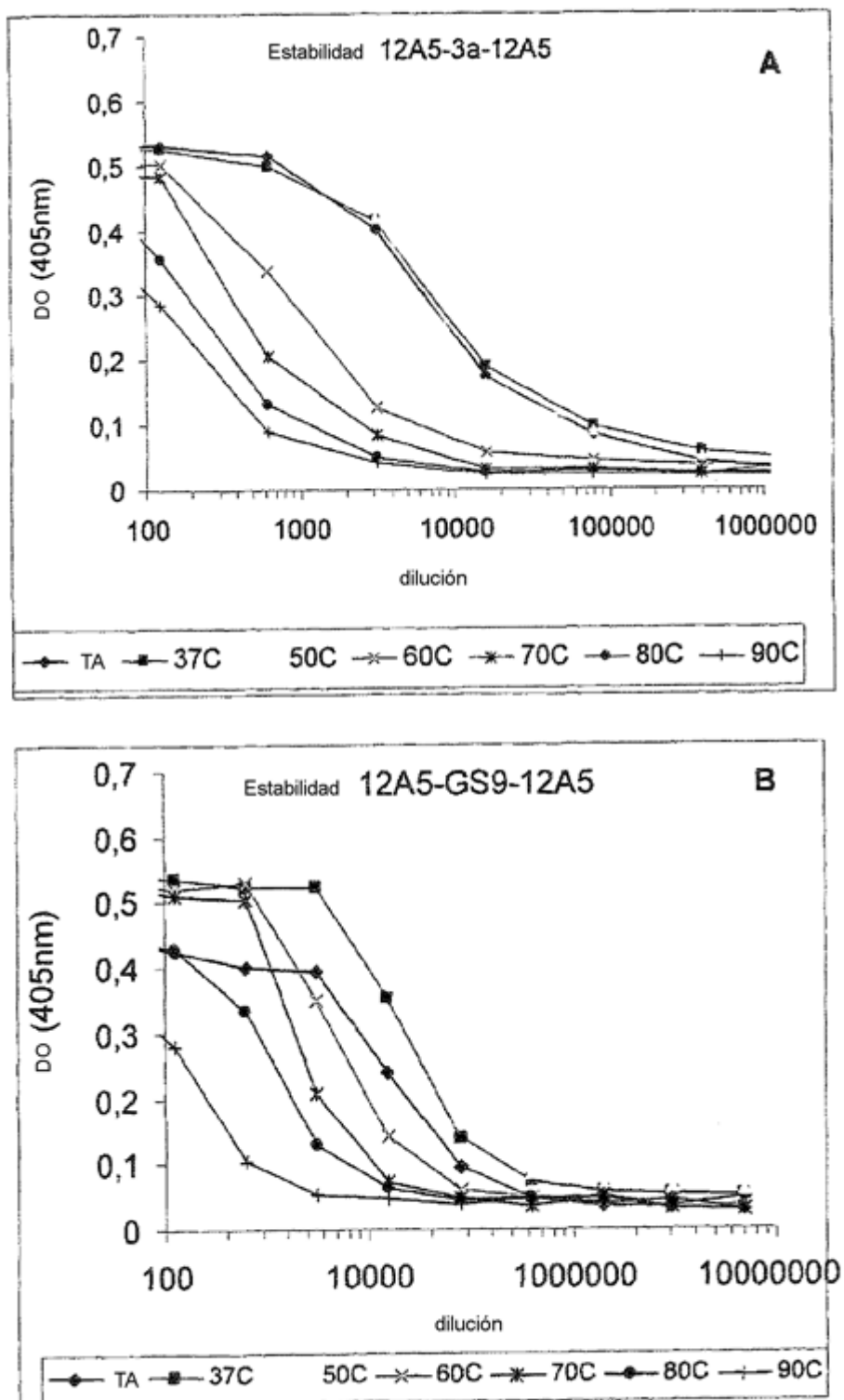


Figura 14-1

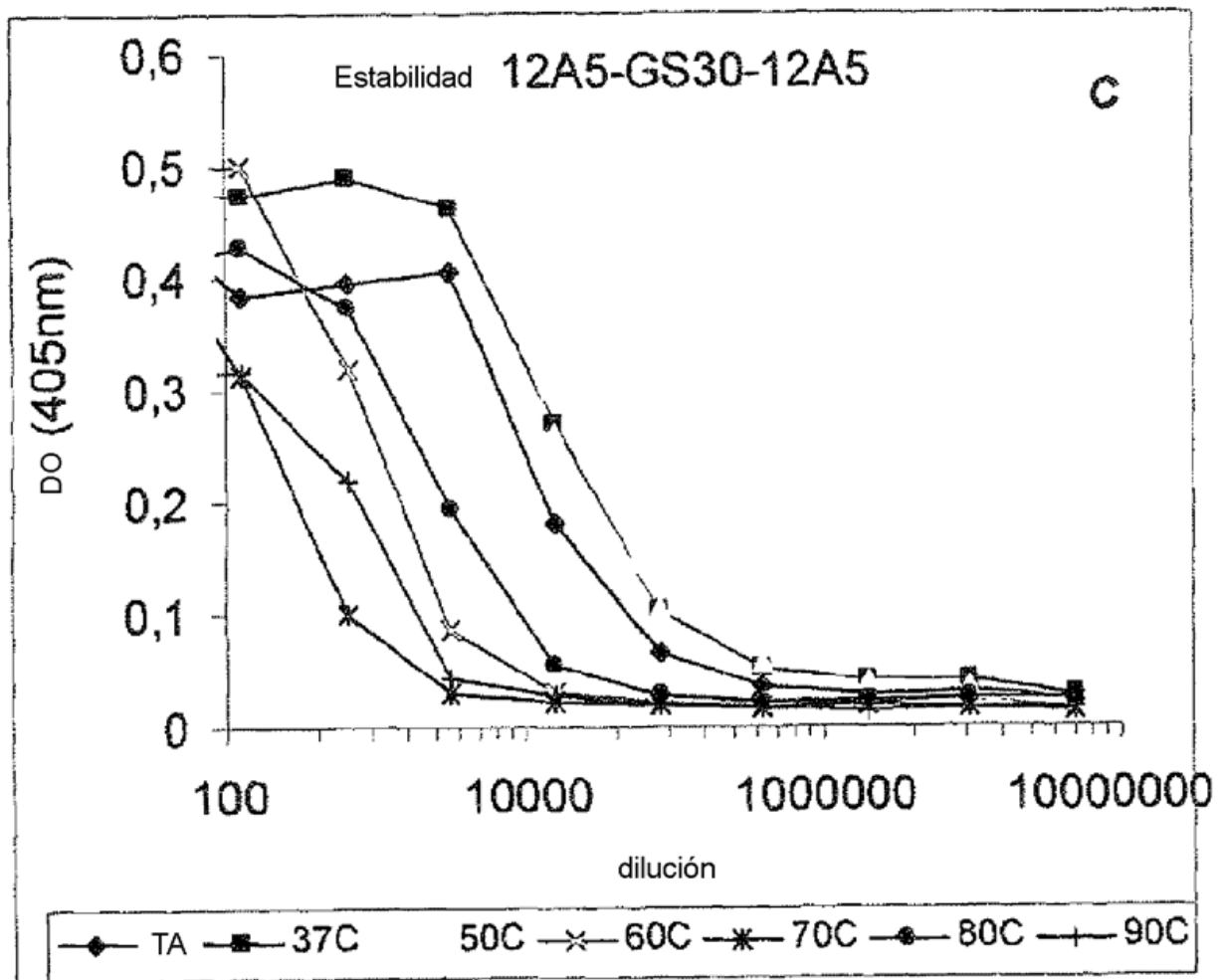


Figura 14-2

|        |                                                   |
|--------|---------------------------------------------------|
| 12B6   | QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVA  |
| 12B6H1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVA  |
| 12B6H2 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVA |
| 12B6H3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVA  |
| 12B6H4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRDVA  |
|        |                                                   |
| 12B6   | ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALKPEDTA        |
| 12B6H1 | ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTA        |
| 12B6H2 | ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTA        |
| 12B6H3 | ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTA        |
| 12B6H4 | ISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTA        |
|        |                                                   |
| 12B6   | VYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS              |
| 12B6H1 | VYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS              |
| 12B6H2 | VYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS              |
| 12B6H3 | VYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS              |
| 12B6H4 | VYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS              |

Figura 15

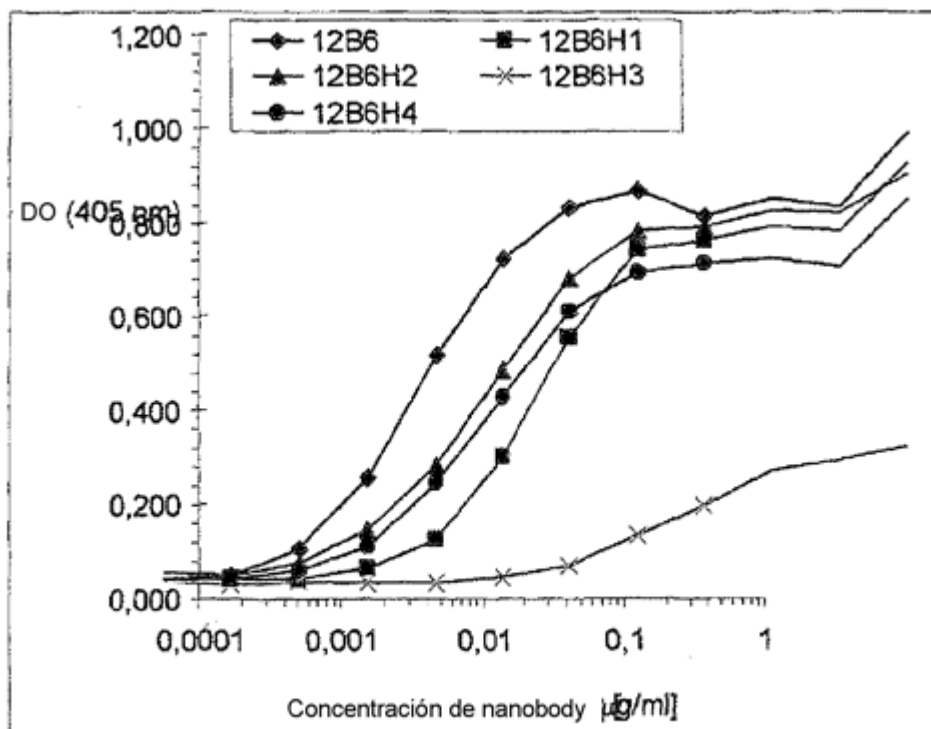


Figura 16

|         |                                                    |
|---------|----------------------------------------------------|
| 12A2    | QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAA |
| 12A2H1  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA  |
| 12A2H3  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA  |
| 12A2H4  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA  |
| 12A2H11 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA  |
| 12A2H13 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA  |
| 12A2    | ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAA    |
| 12A2H1  | ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA    |
| 12A2H3  | ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA    |
| 12A2H4  | ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA   |
| 12A2H11 | ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA    |
| 12A2H13 | ISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA   |
| 12A2    | GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                      |
| 12A2H1  | GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                      |
| 12A2H3  | GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                      |
| 12A2H4  | GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                      |
| 12A2H11 | GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                      |
| 12A2H13 | GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                      |

Figura 17



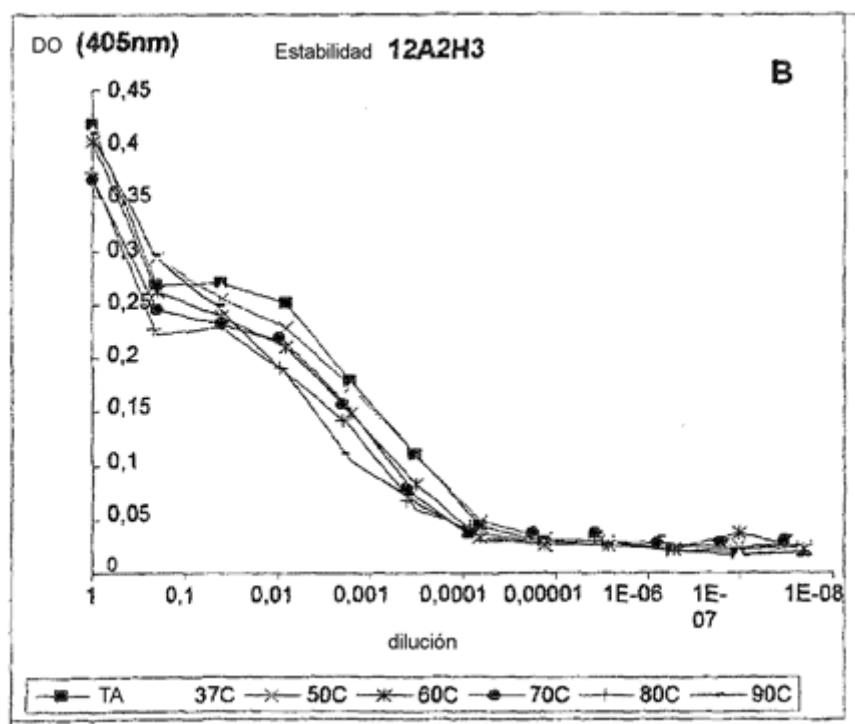
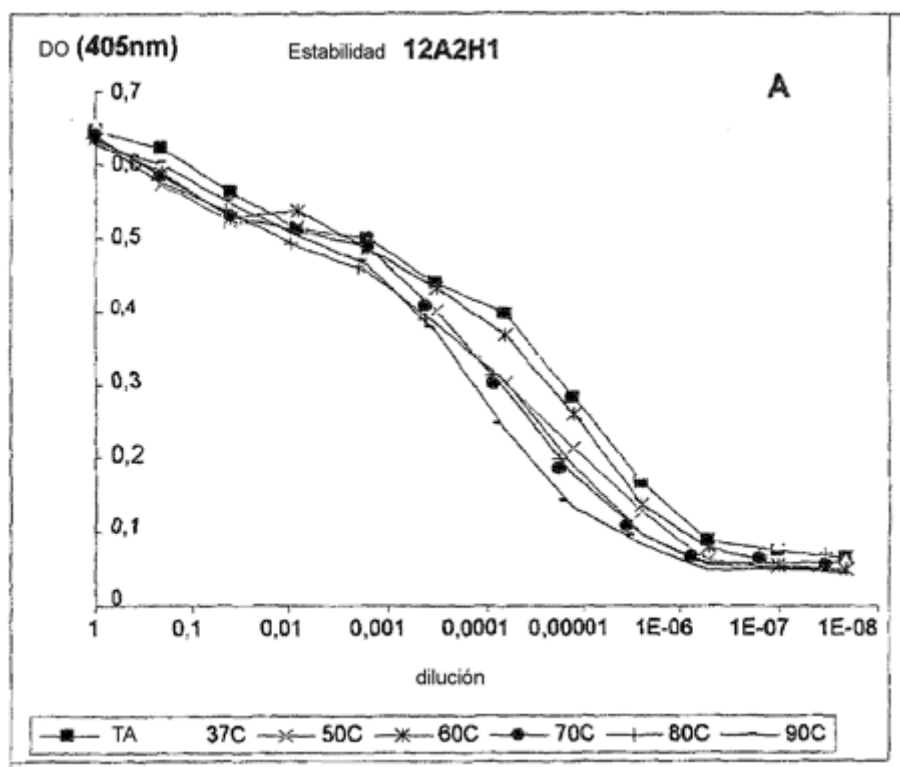


Figura 18 - 1

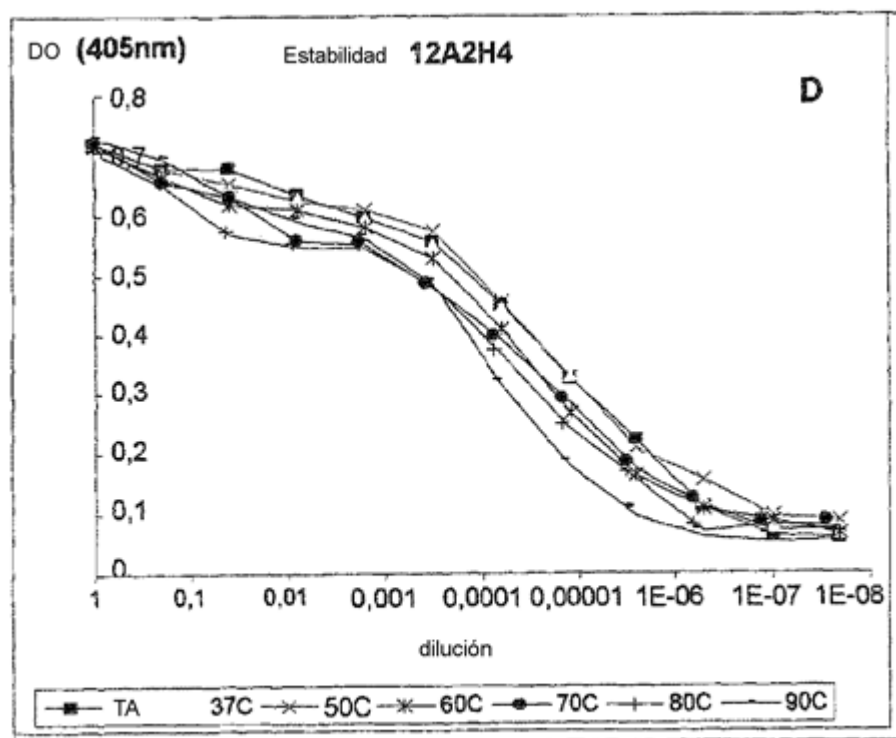
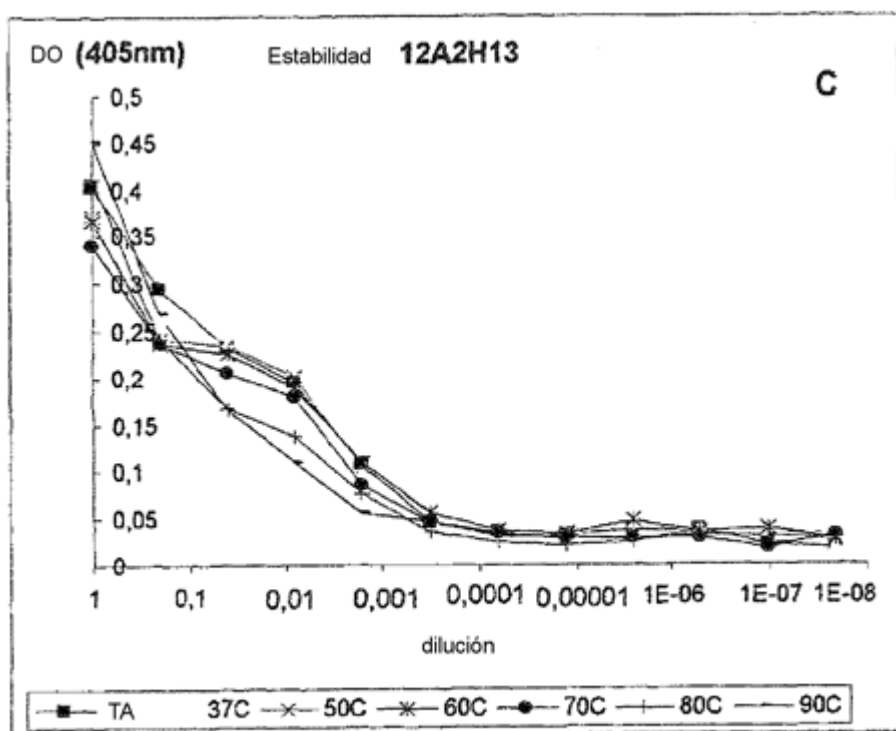


Figura 18 - 2

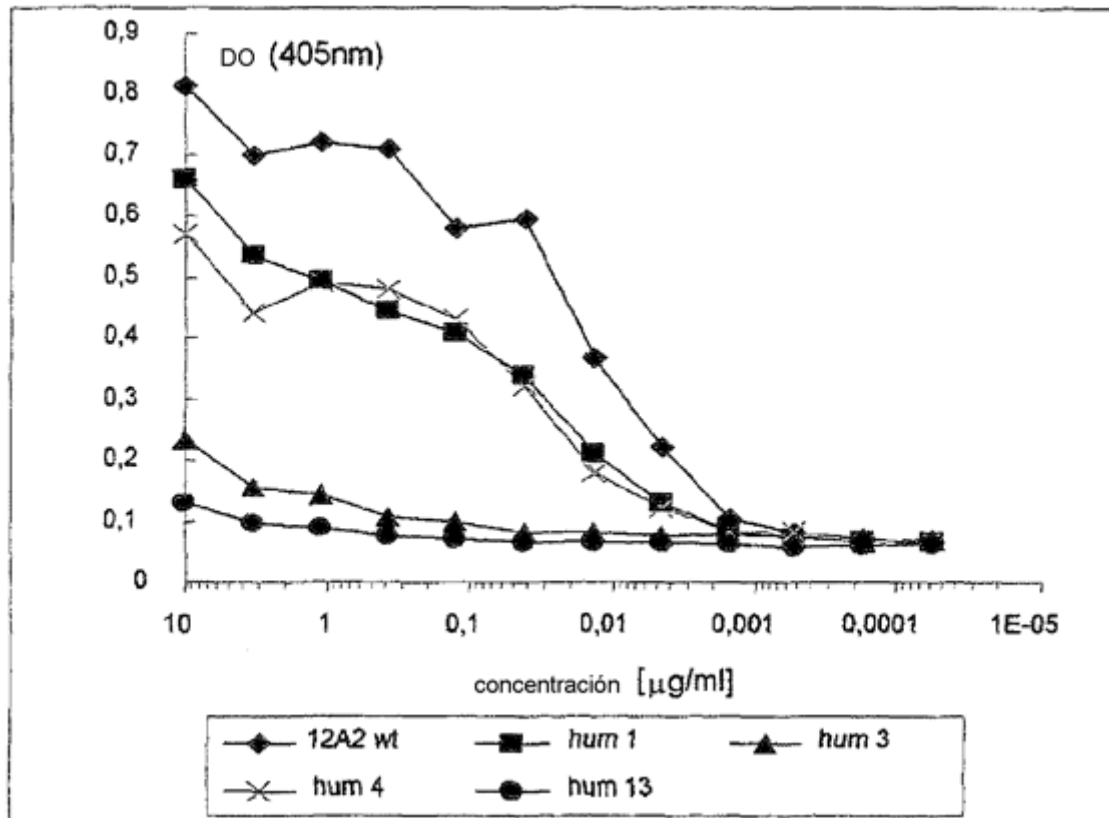


Figura 19

|        |                                                |
|--------|------------------------------------------------|
| 12A5   | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQREL |
| 12A5H1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQREL |
| 12A5H2 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQREL |
| 12A5H3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQREL |
| 12A5   | VATITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY |
| 12A5H1 | VATITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY |
| 12A5H2 | VATITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY |
| 12A5H3 | VATITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY |
| 12A5   | CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS                   |
| 12A5H1 | CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS                   |
| 12A5H2 | CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS                   |
| 12A5H3 | CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS                   |

Figura 20

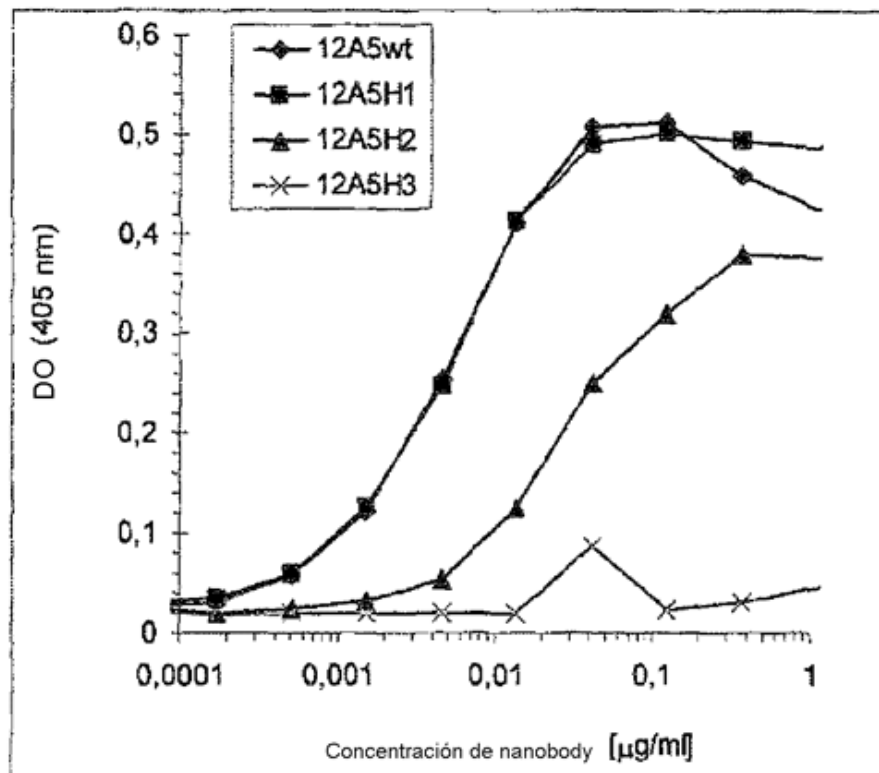


Figura 21

|        |                                                   |
|--------|---------------------------------------------------|
| 12A2H1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA |
| 12A2H4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA |
| 12B6H2 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV  |
| 12A2H1 | AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA |
| 12A2H4 | AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA |
| 12B6H2 | AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA |
| 12A2H1 | AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                    |
| 12A2H4 | AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS                    |
| 12B6H2 | AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS                    |

Figura 22

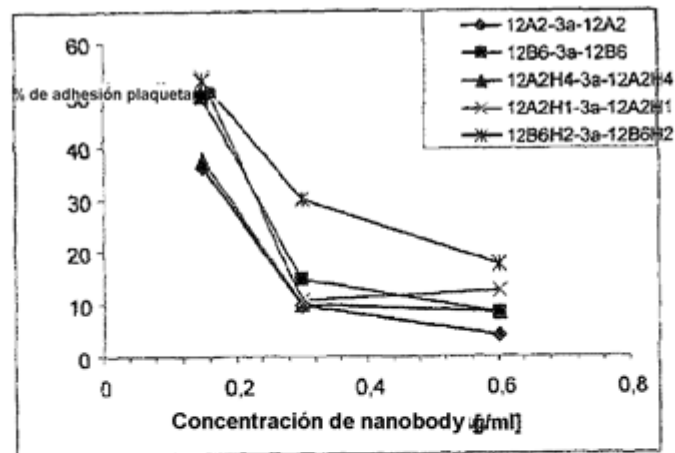


Figura 23

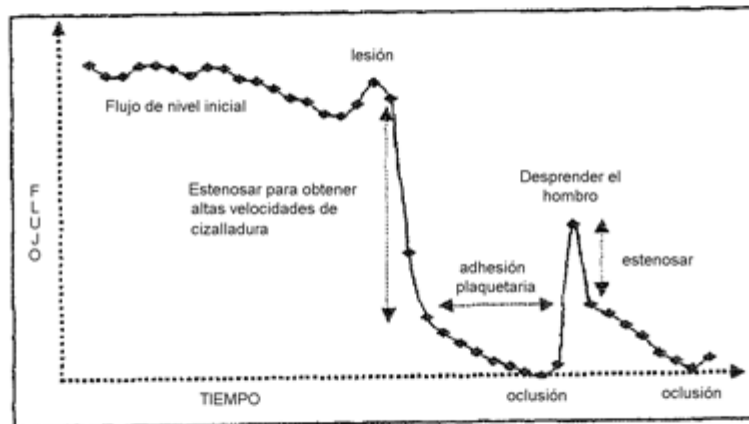


Figura 24

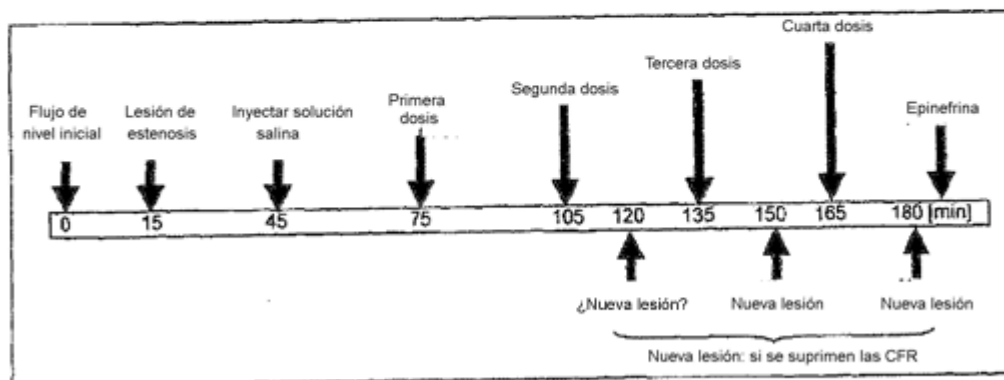


Figura 25

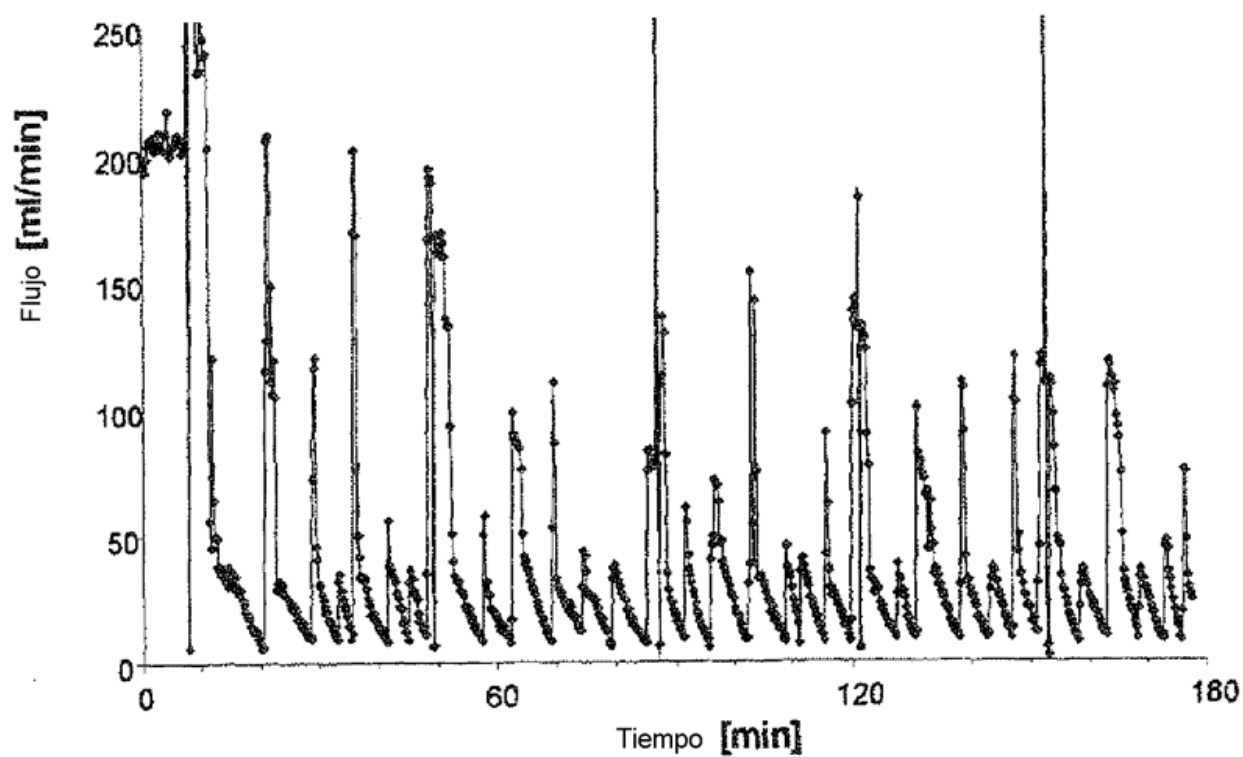


Figura 26

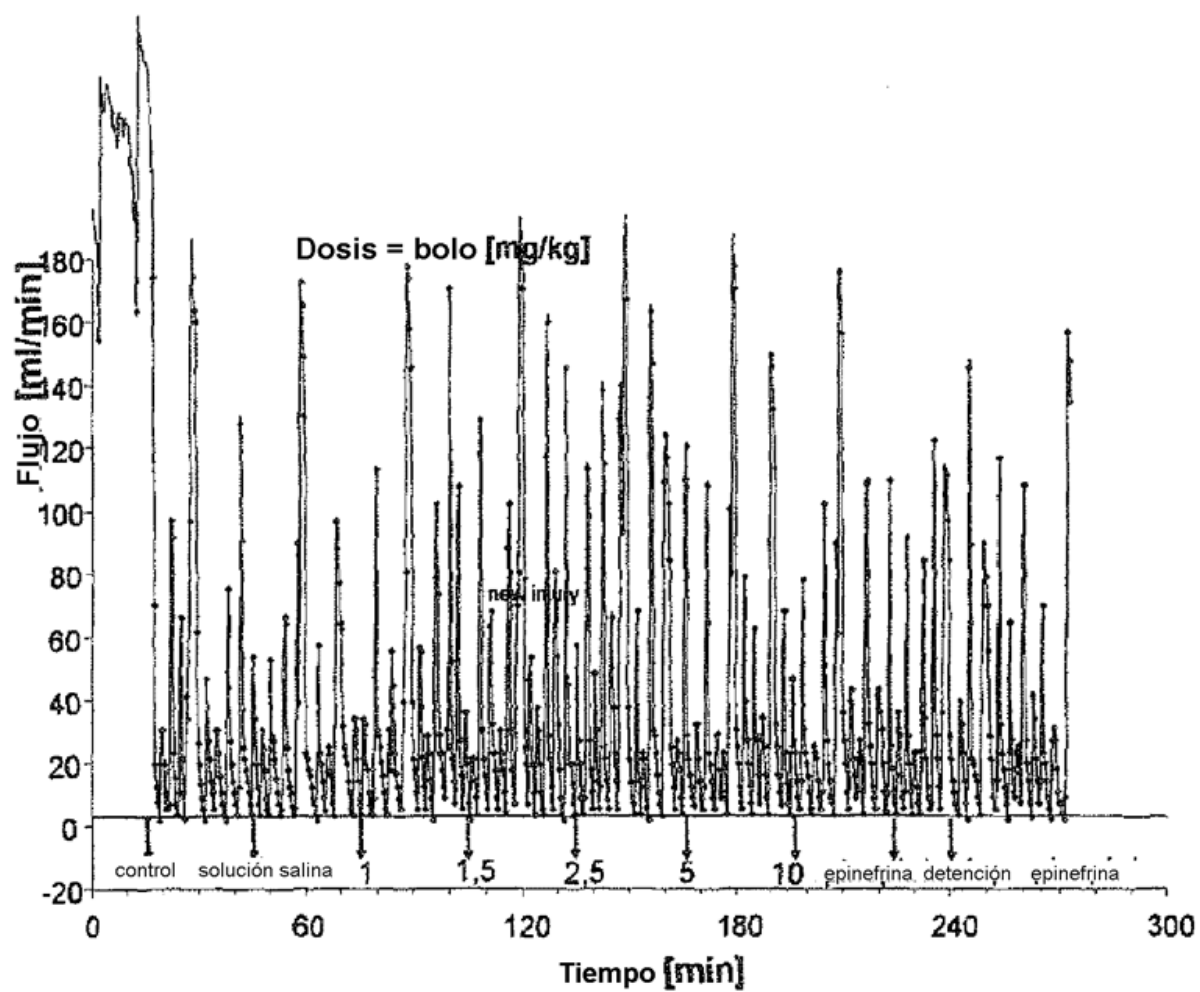


Figura 27

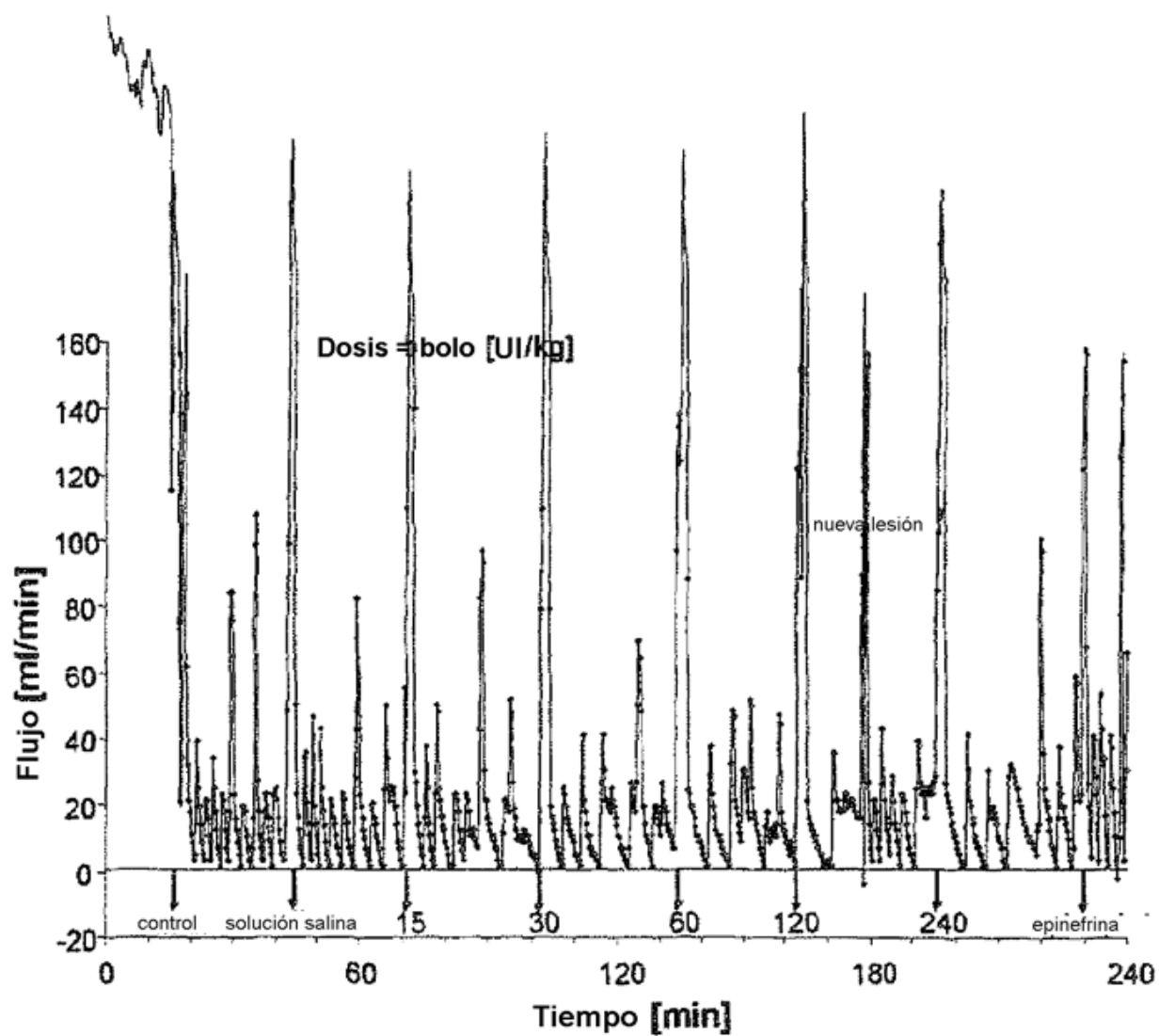


Figura 28



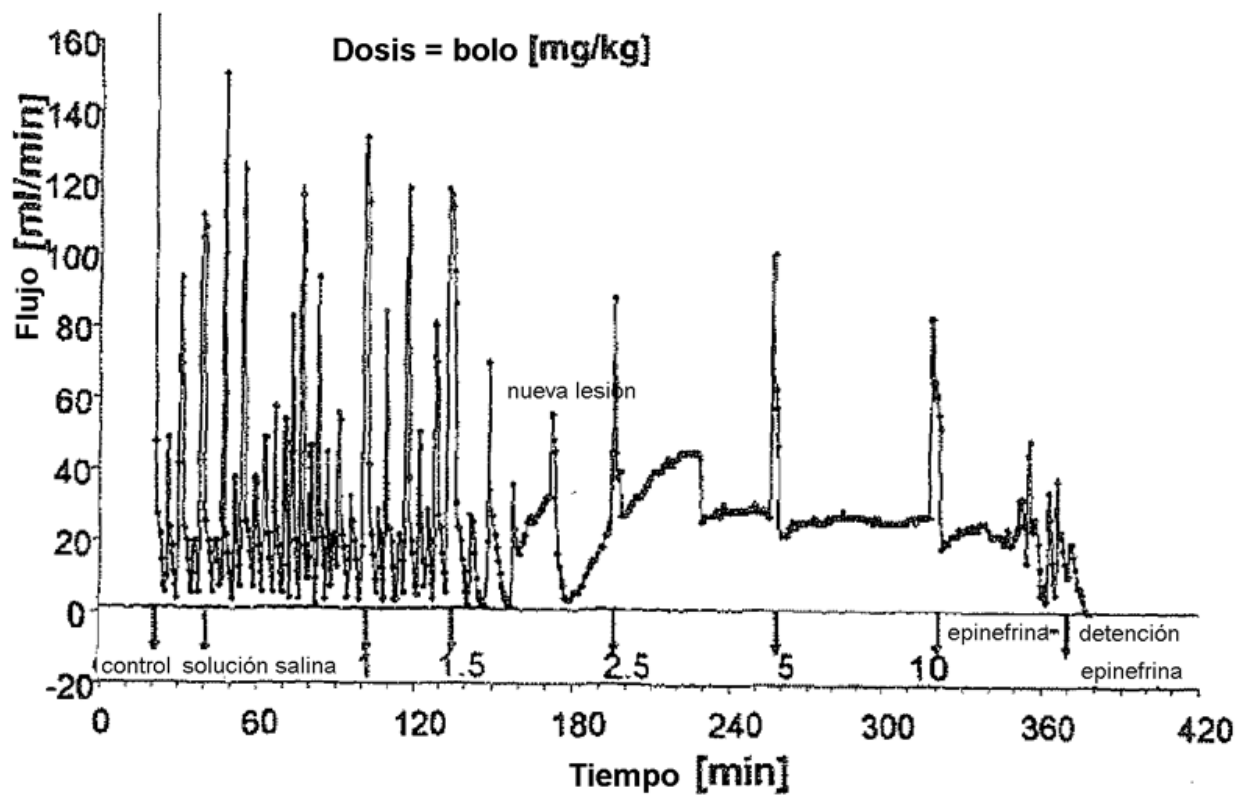


Figura 29

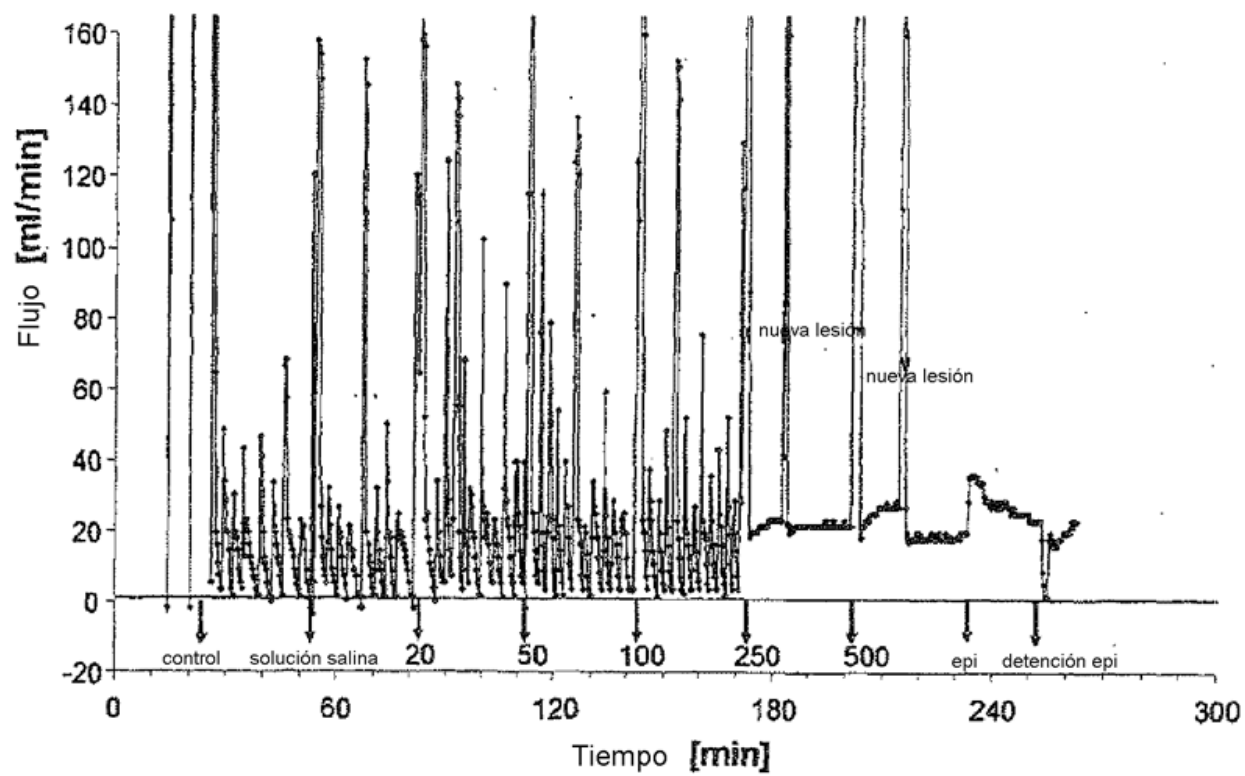


Figura 30

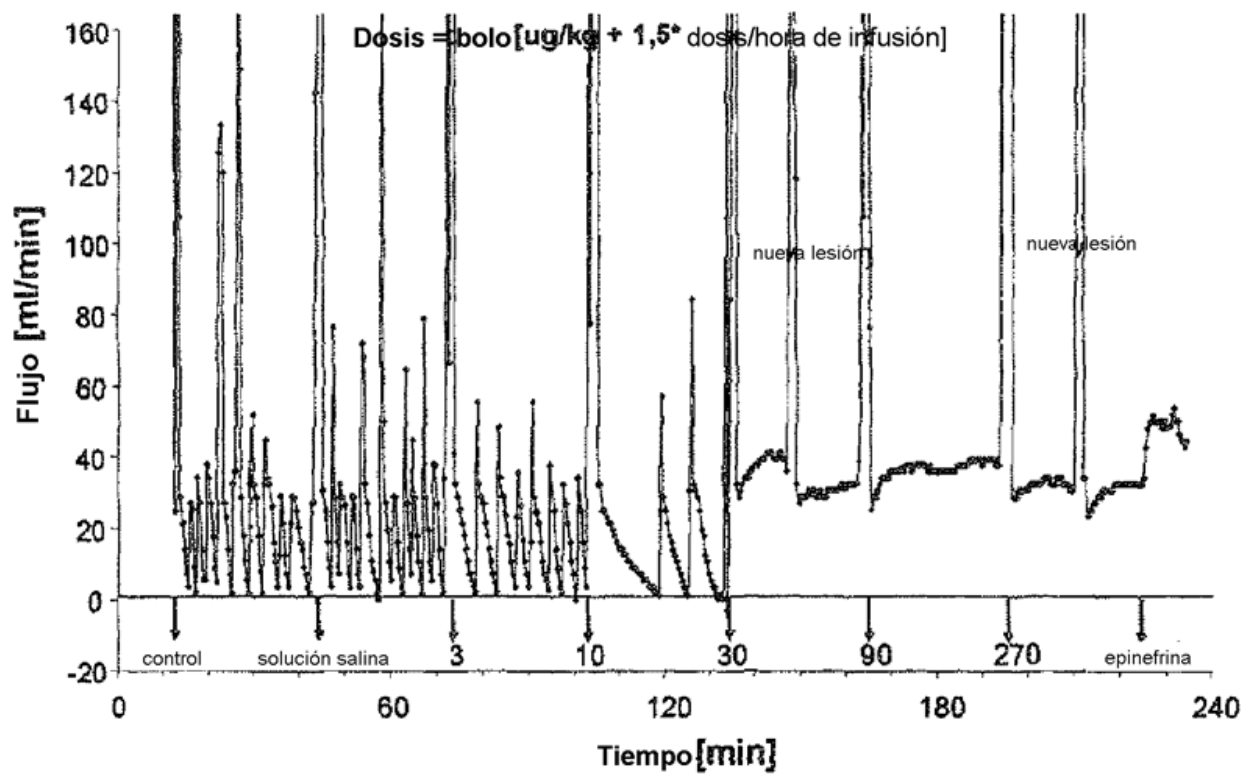


Figura 31

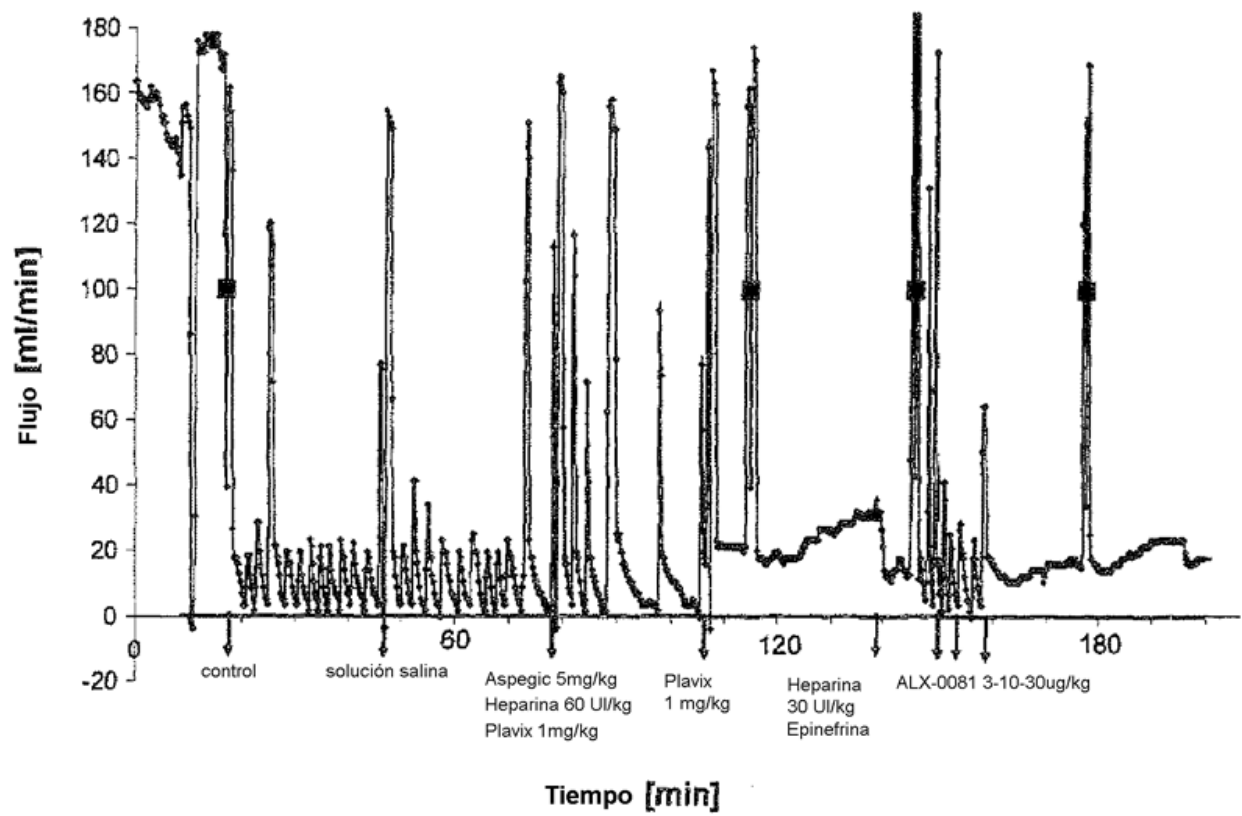


Figura 32

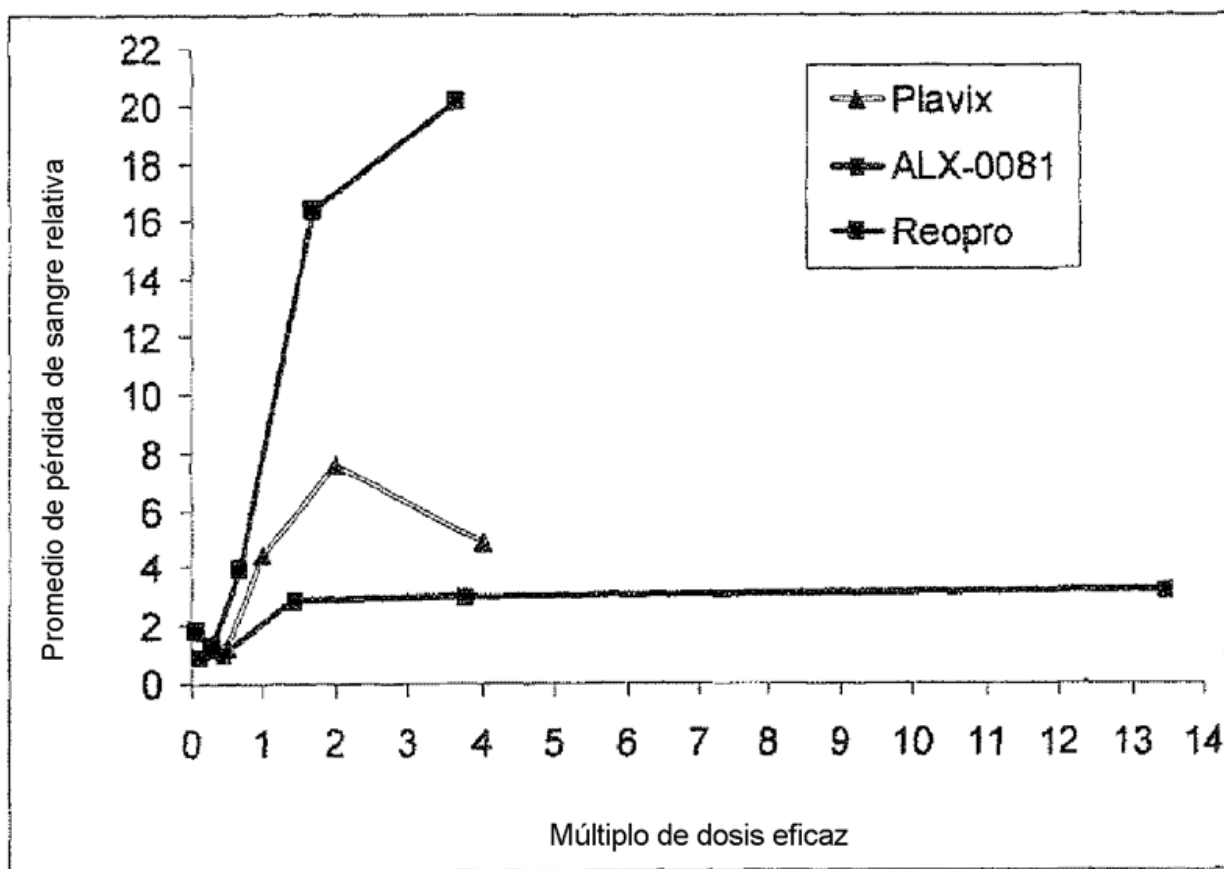


Figura 33

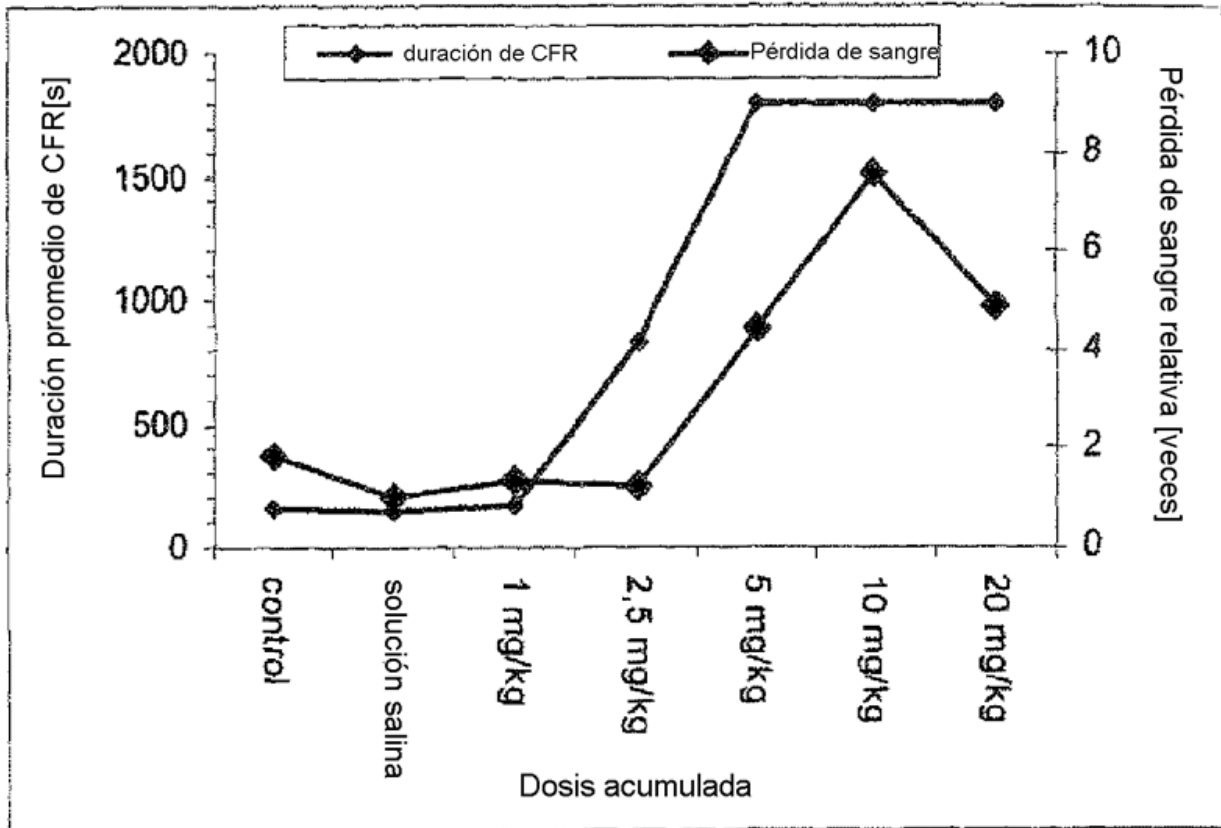


Figura 34

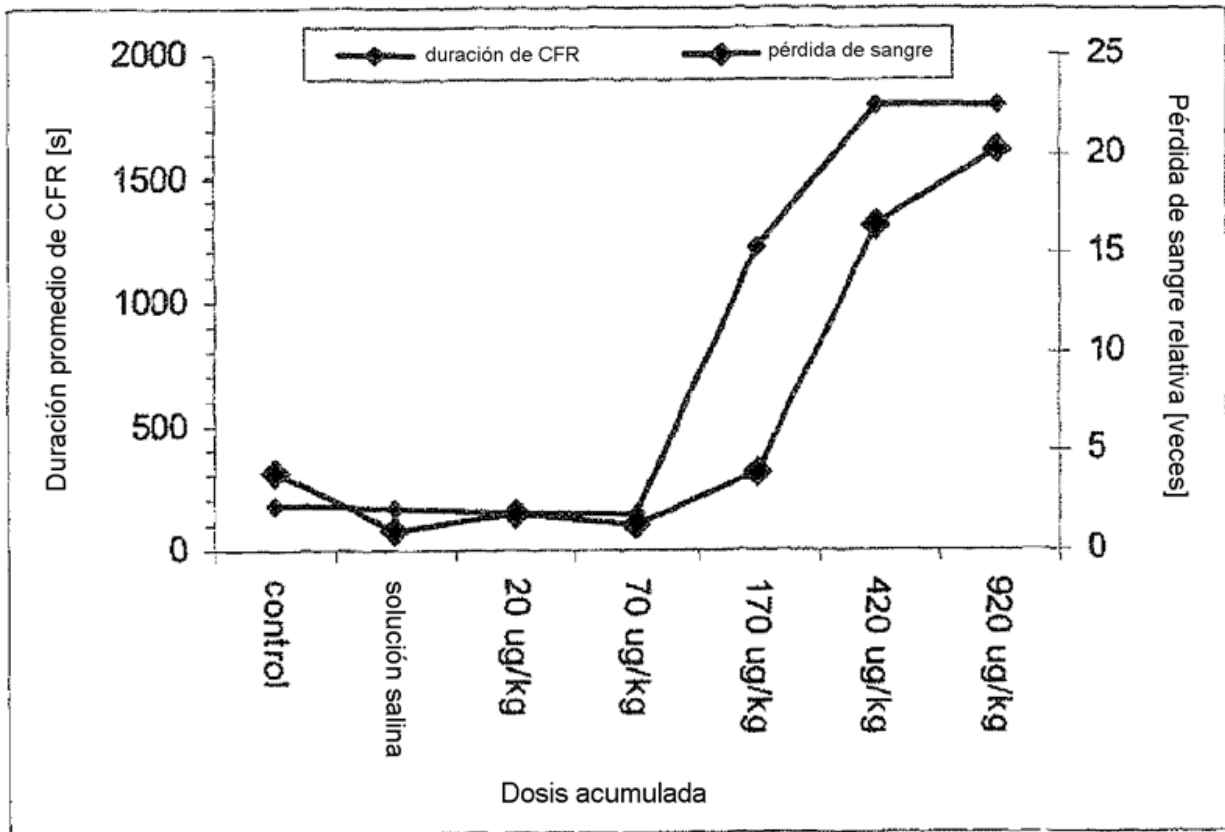


Figura 35

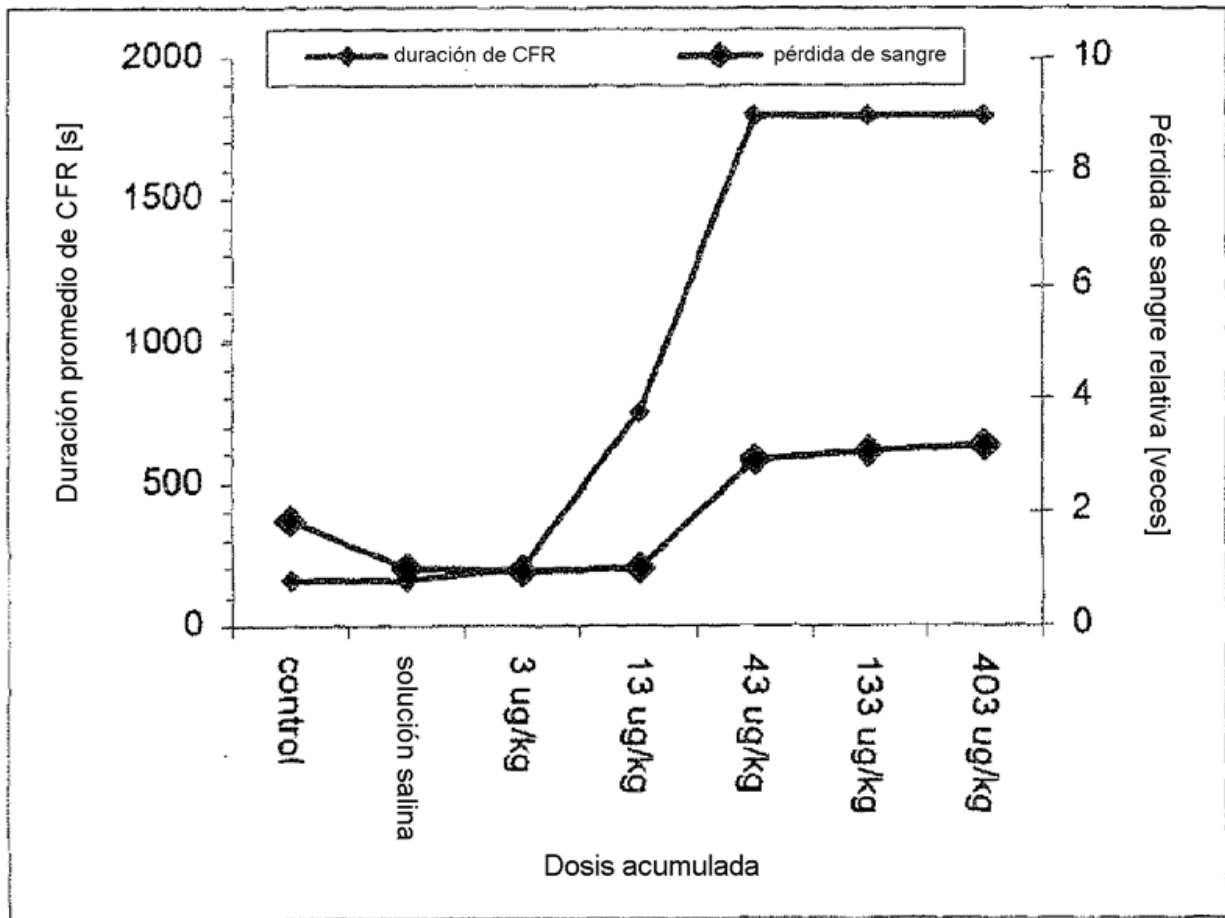


Figura 36



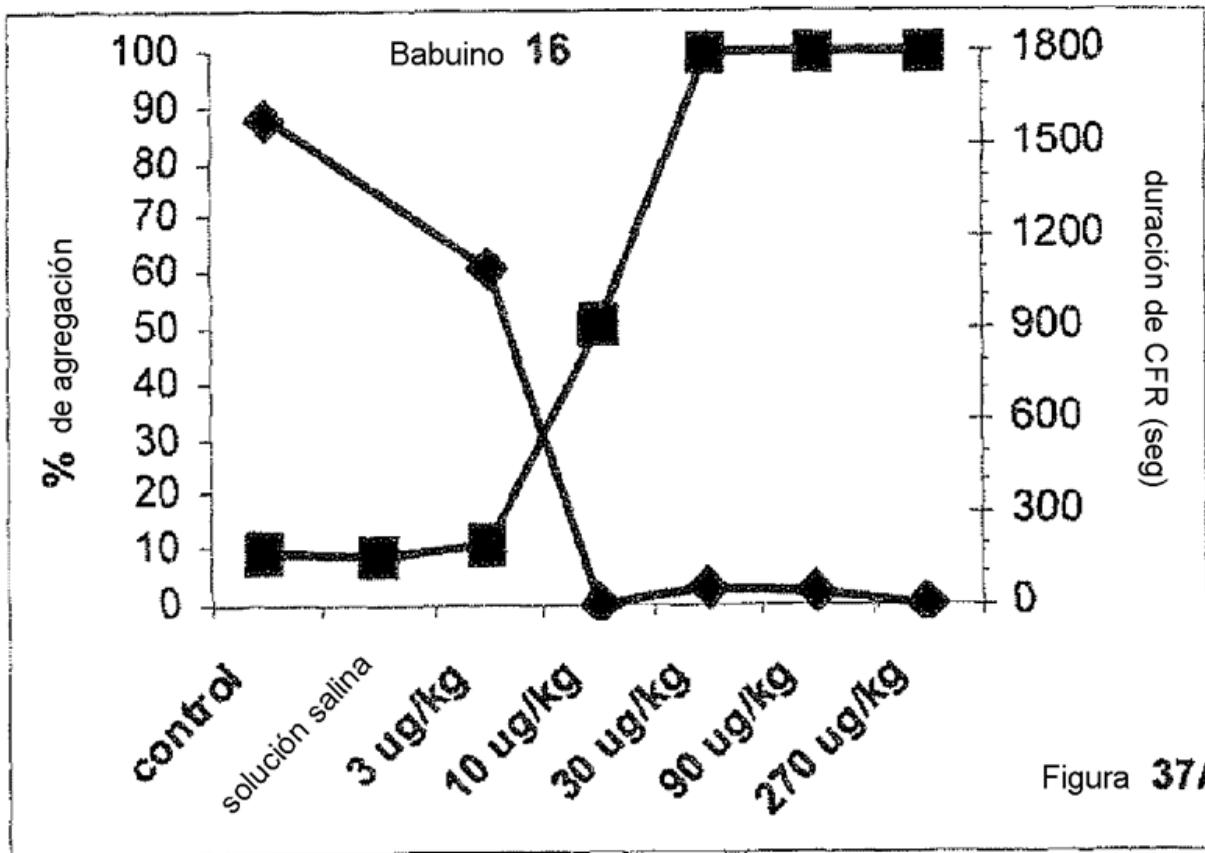
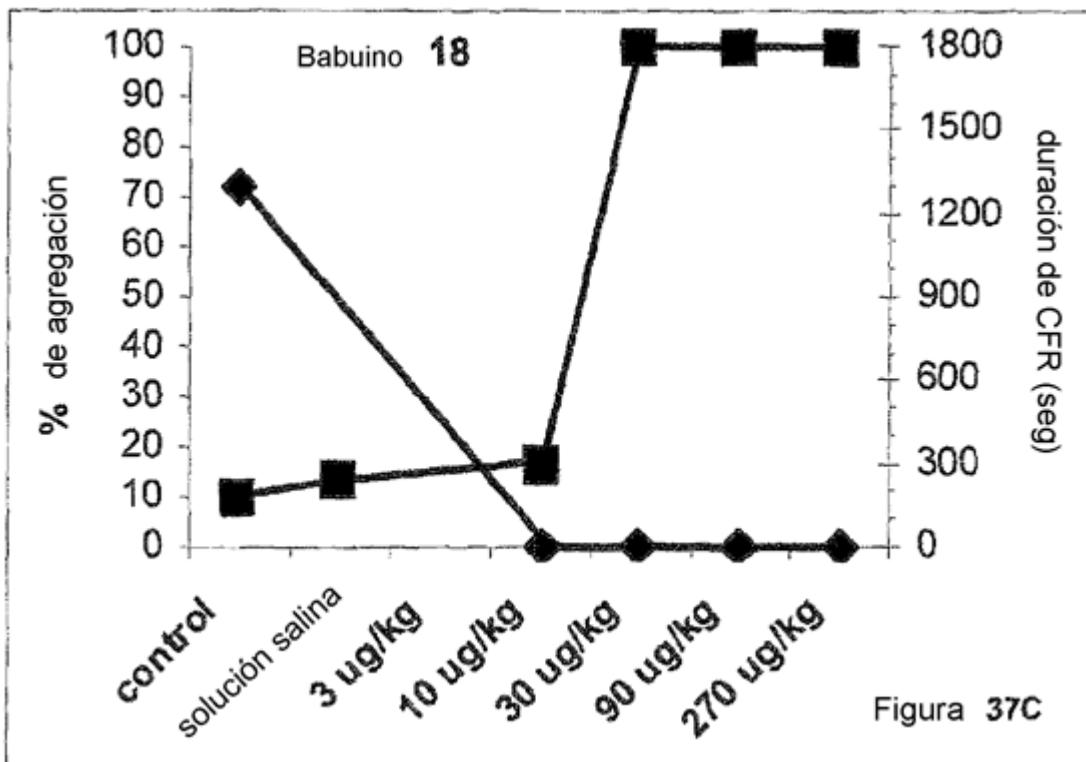
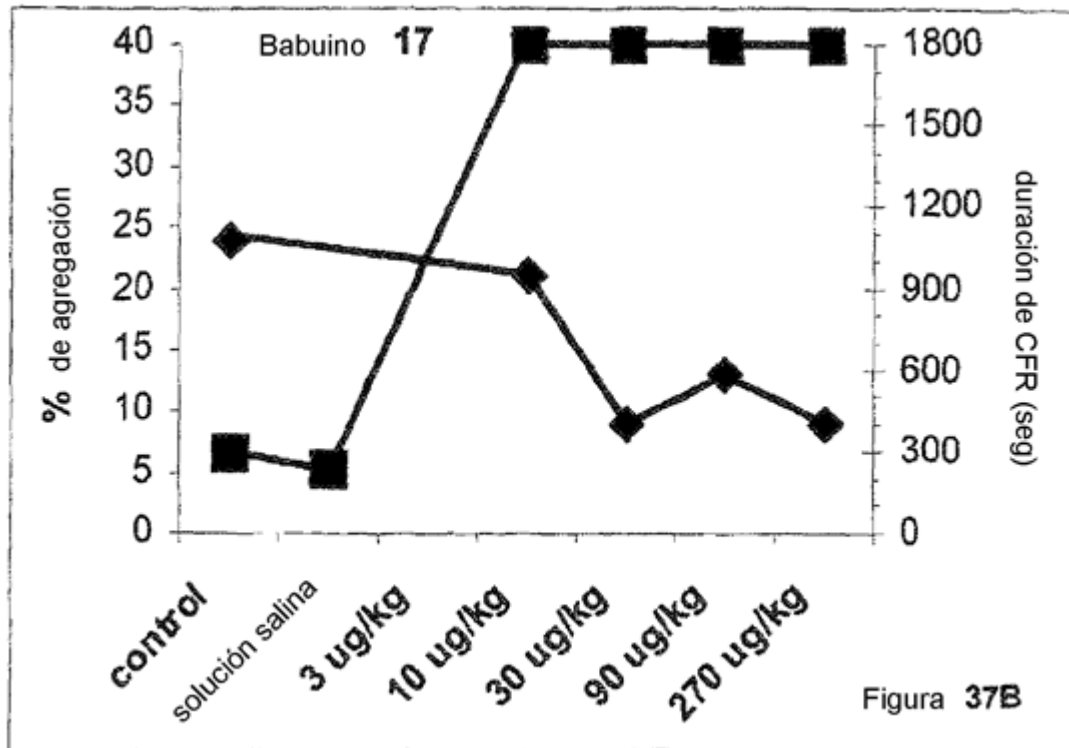
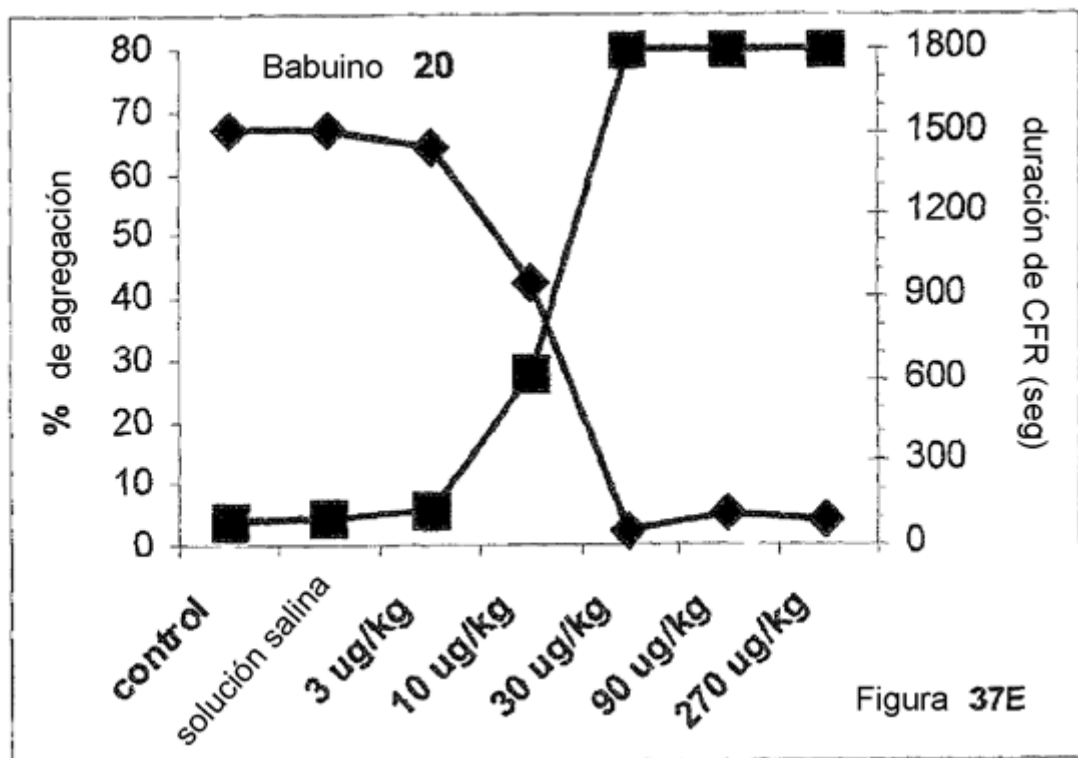
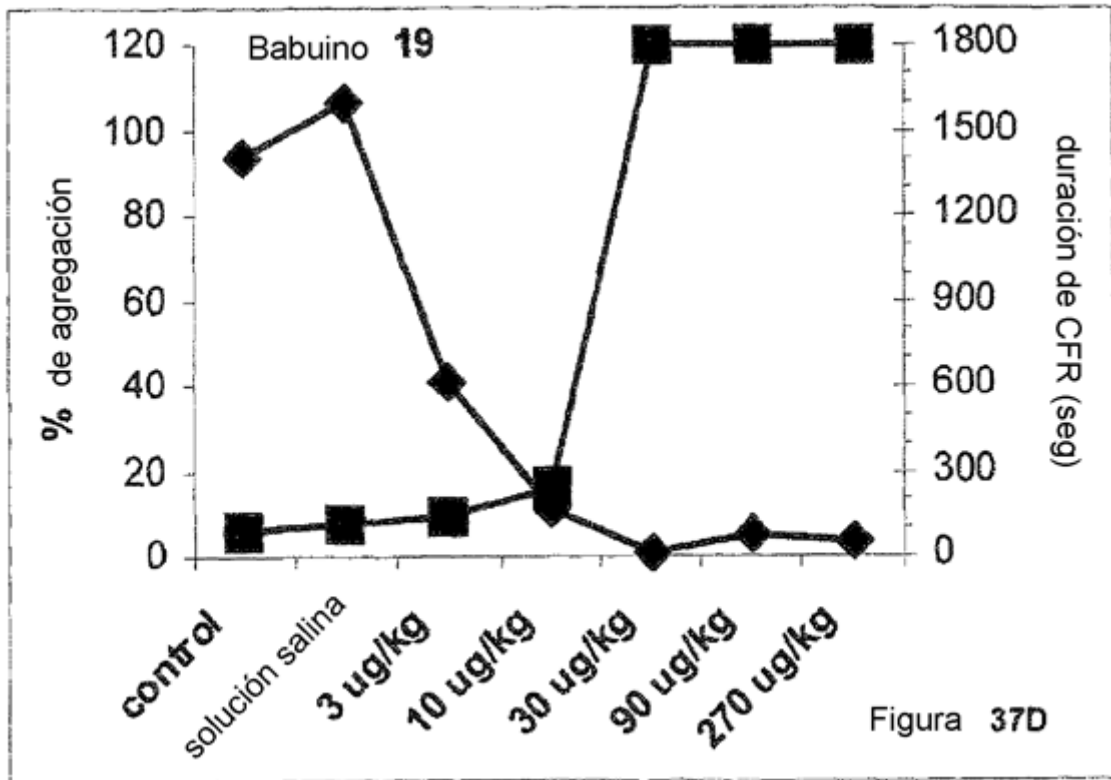
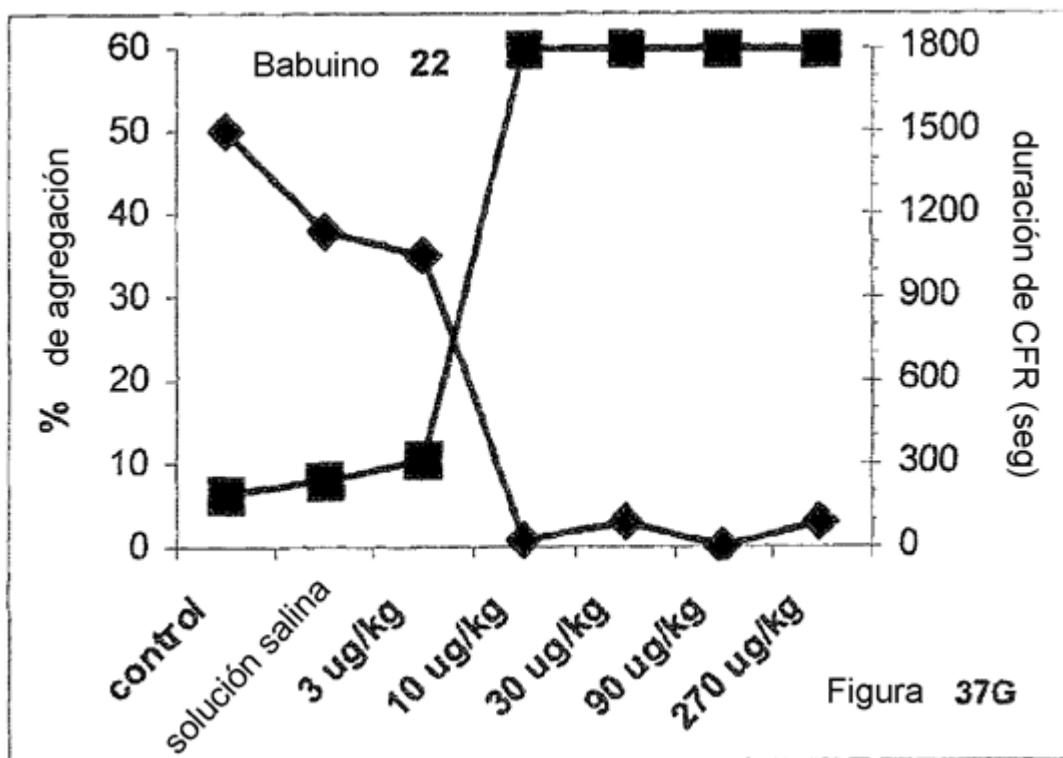
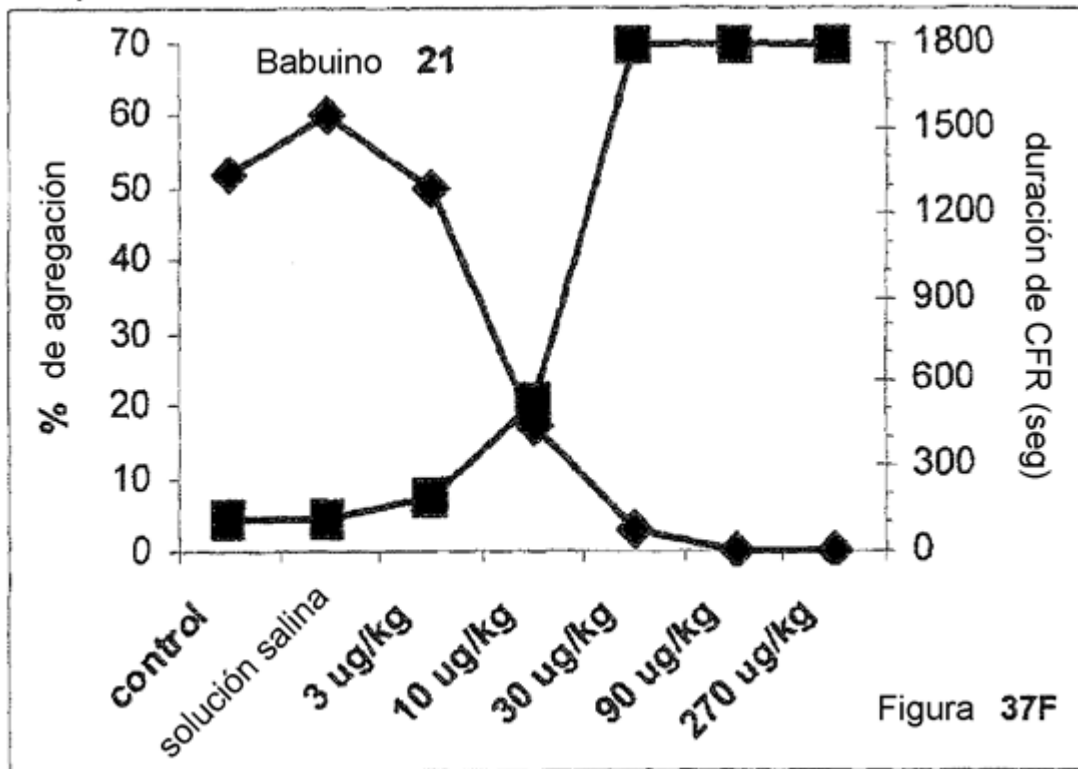
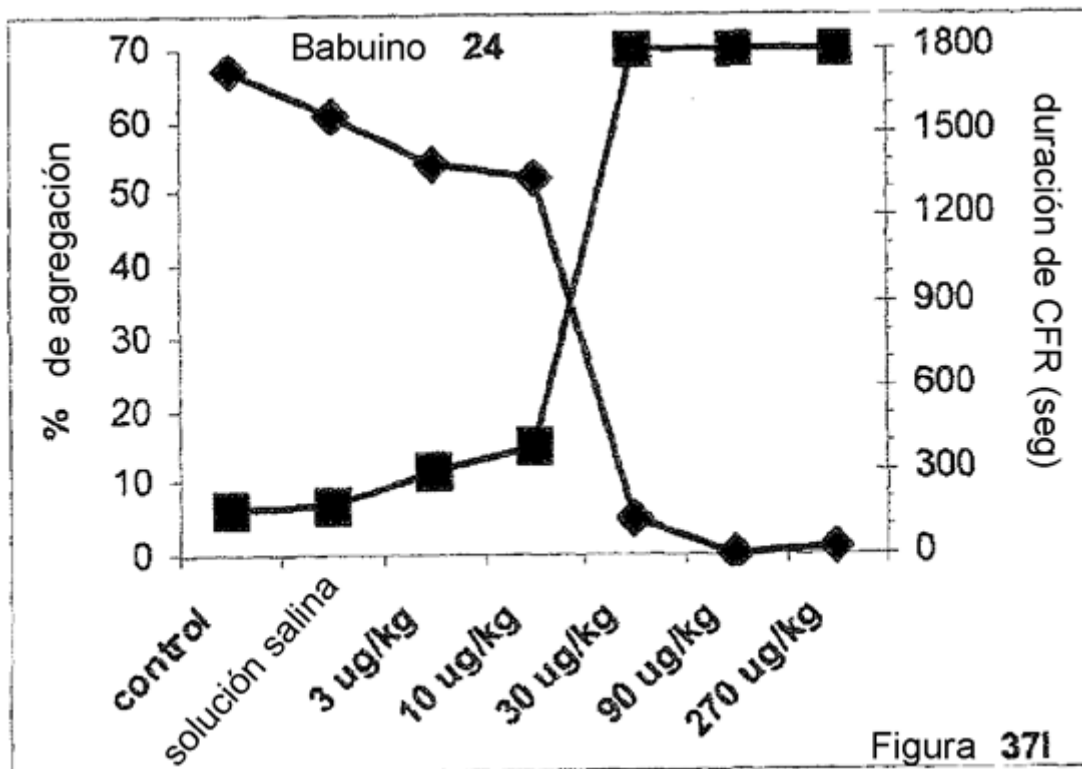
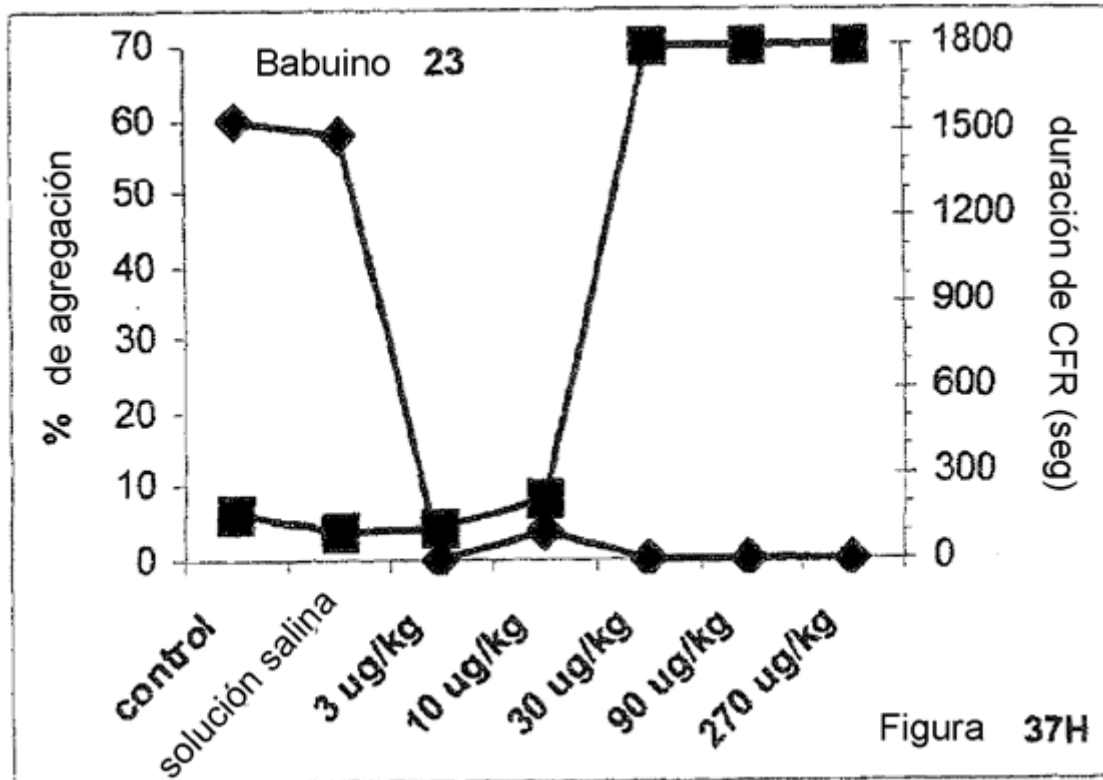


Figura 37A









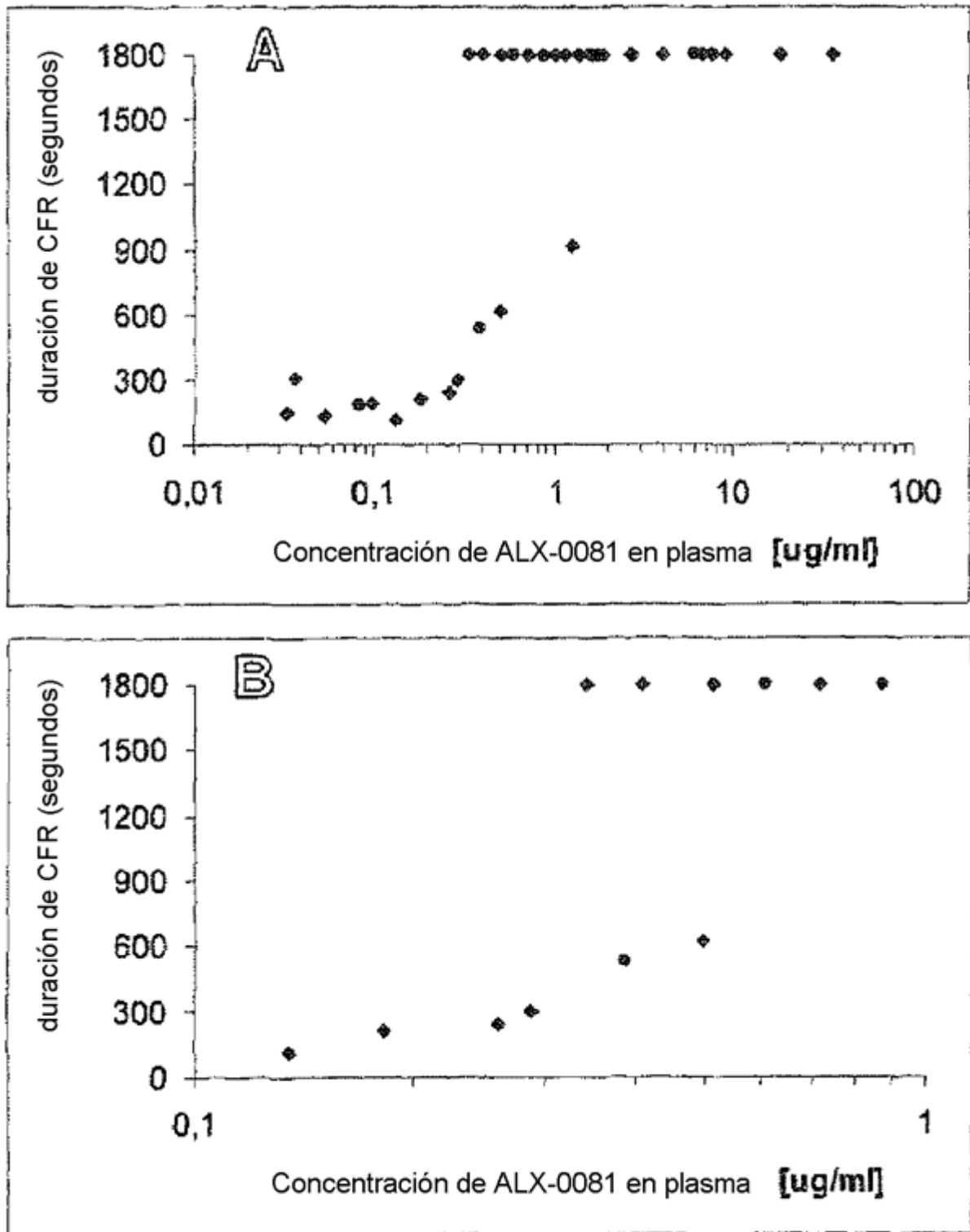


Figura 38

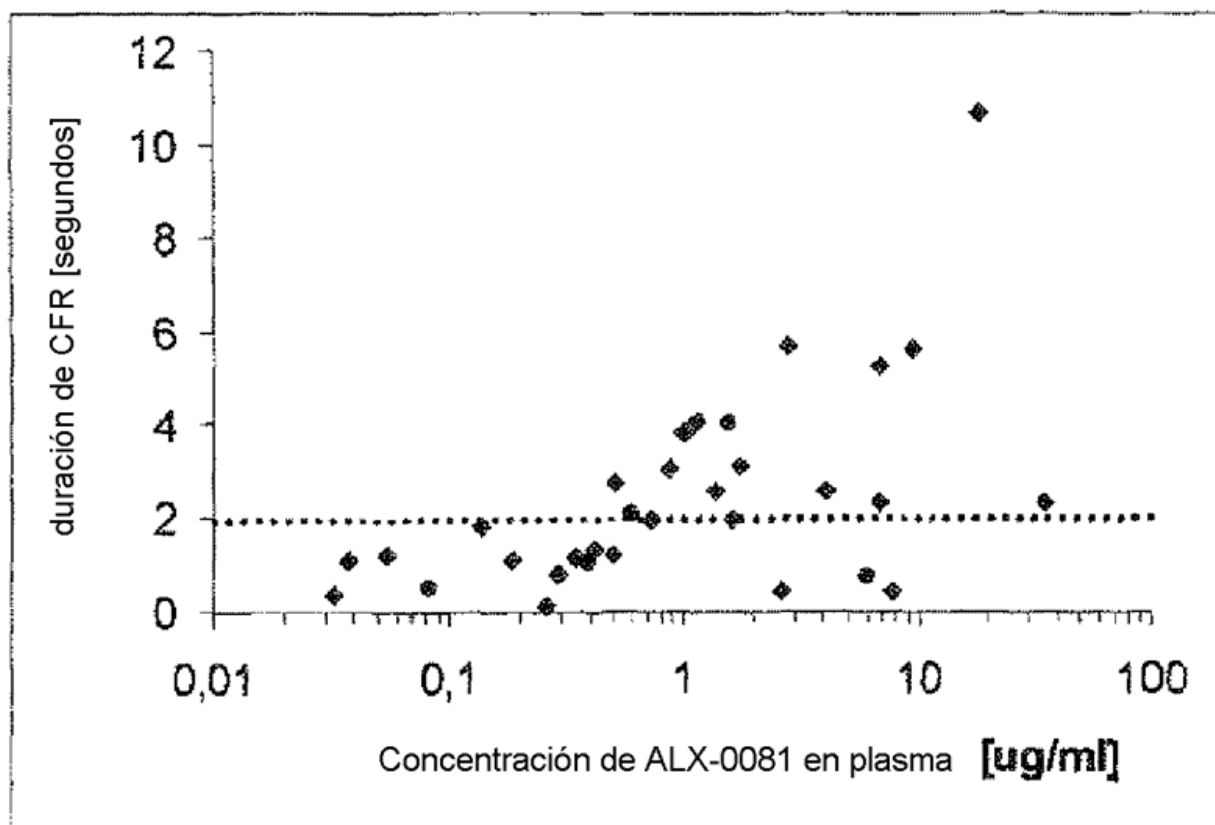


Figura 39

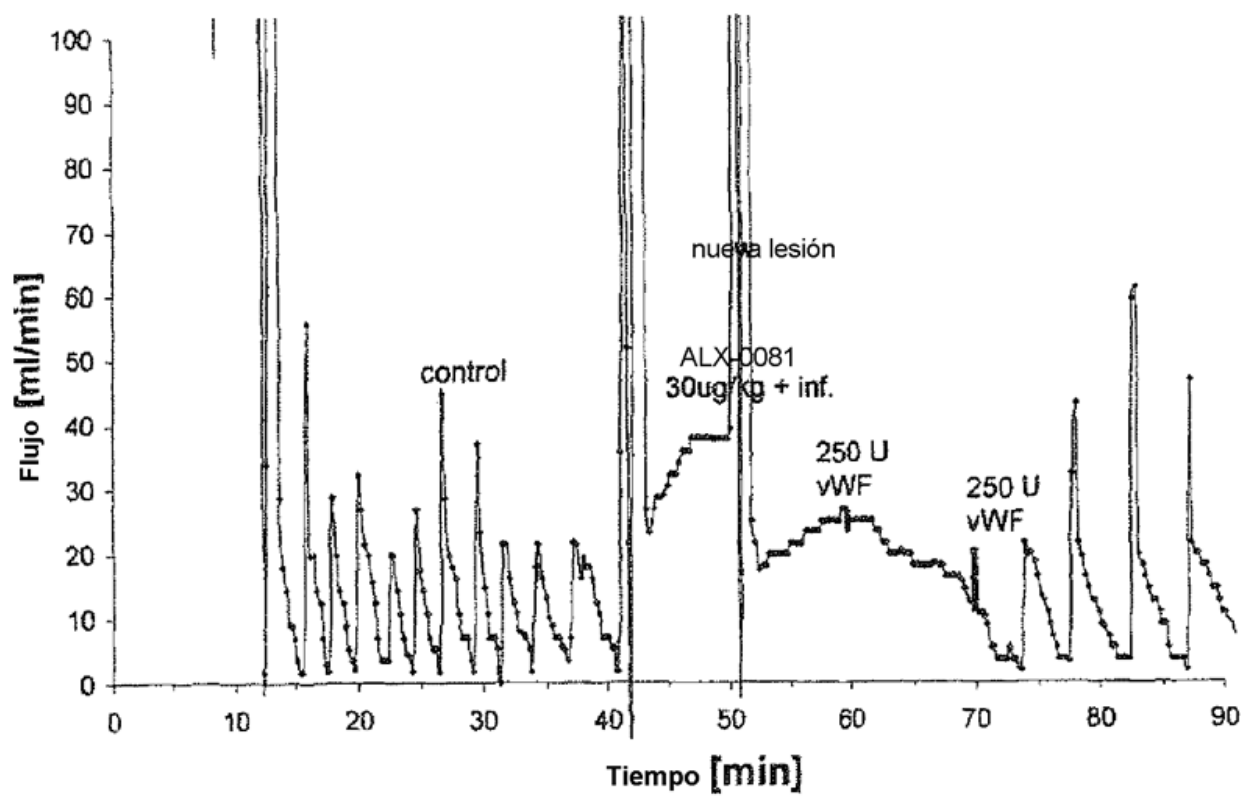


Figura 40



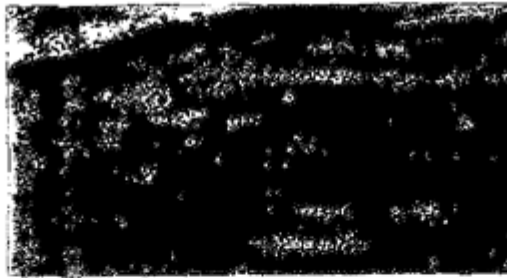


Figura 41



Figura 42



Figura 43

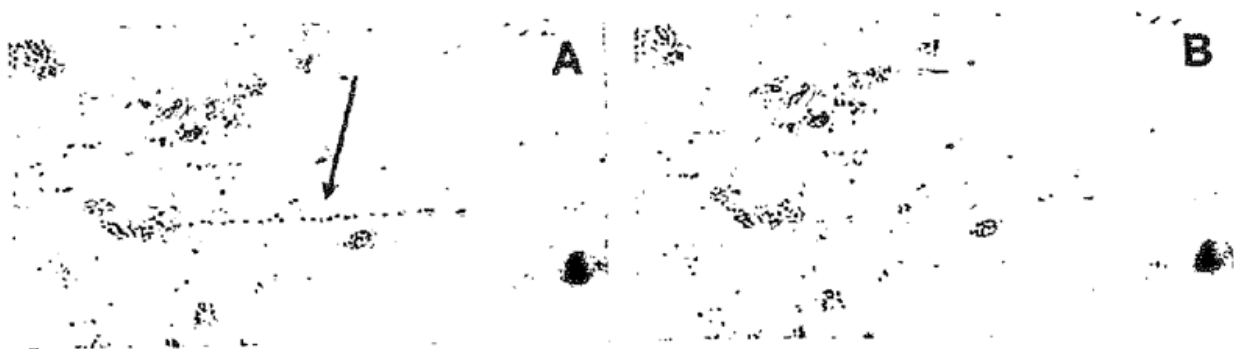


Figura 44

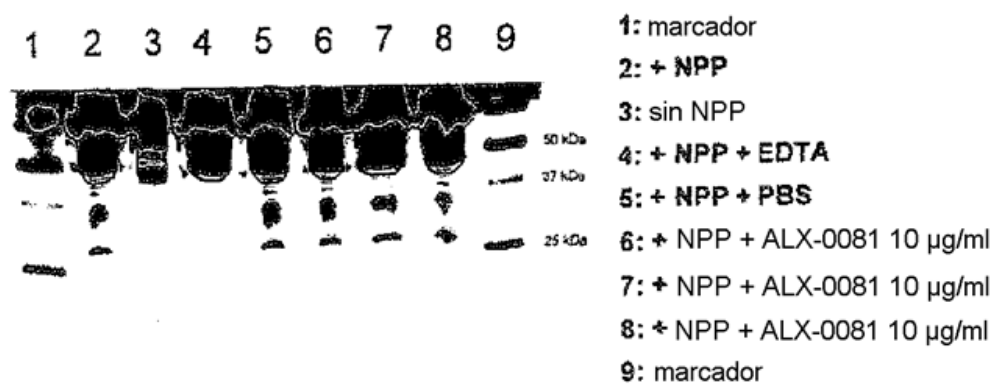


Figura 45