

COMPUESTOS DE ISVD ALTAMENTE POTENTES CAPACES DE SUSTITUIR AL FVIII(A)

CAMPO TÉCNICO

- 5 La invención se refiere a compuestos capaces de unirse a los factores de coagulación IX(a) y X(a) y su uso en el tratamiento de una coagulopatía, tal como las diversas formas de hemofilia, lo que incluye la hemofilia A.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS COMO REFERENCIA

- 10 La presente solicitud se presenta con un listado de secuencias en formato electrónico. El contenido completo del listado de secuencias se incorpora aquí como referencia.

ANTECEDENTES

- En pacientes con una coagulopatía, tal como en seres humanos con hemofilia A (HA) y B (HB),
15 varias etapas de la cascada de coagulación se vuelven disfuncionales debido, por ejemplo, a la ausencia o presencia insuficiente de un factor de coagulación funcional. Dicha disfunción de una parte de la cascada de coagulación da como resultado una coagulación de la sangre insuficiente y hemorragias potencialmente mortales, o daño a los órganos internos, tales como las articulaciones. La deficiencia del factor de coagulación VIII (FVIII), comúnmente referida como hemofilia A, es
20 un trastorno hemorrágico congénito que afecta aproximadamente a 420,000 personas en todo el mundo, de las cuales aproximadamente 105,000 se diagnostican actualmente. La hemofilia A tiene tres grados de gravedad definidos por los niveles plasmáticos del factor FVIII de 1 % o menos ("grave"), 2 a 5 % ("moderado") y 6 a 30 % ("leve") (White y otros. (2001) Thromb. Haemost. 85:560) o 5-40 % de acuerdo con WFH "Guidelines for the management of haemophilia" 2da
25 edición Haemophilia; Epub 6 JUL 2012. Una hemorragia puede aparecer espontáneamente, o después de un traumatismo. Aproximadamente la mitad de todos los pacientes con hemofilia A se clasifican como que tienen hemofilia A grave y experimentan hemorragias graves que comienzan en la primera infancia, y episodios frecuentes de hemorragias espontáneas o excesivas más adelante en la vida. La hemorragia se produce comúnmente en las articulaciones y los músculos, y sin un
30 tratamiento adecuado, la hemorragia recurrente puede conducir a una hemoartropatía irreversible (Manco-Johnson y otros (2007) N. Engl. J. Med. 357: 535-44).

Los pacientes con hemofilia A pueden recibir una terapia de reemplazo del factor de coagulación, tal como el FVIII exógeno. El tratamiento convencional consiste en la terapia de reemplazo, que se proporciona como profilaxis o como el tratamiento a demanda de los episodios de hemorragia. Hasta recientemente, el tratamiento profiláctico para un paciente con hemofilia A grave incluía hasta tres inyecciones intravenosas/semana con FVIII derivado de plasma o FVIII recombinante o variantes de acción prolongada de estos.

Sin embargo, dichos pacientes están en riesgo de desarrollar anticuerpos neutralizantes, llamados inhibidores, a dichos factores exógenos, lo que hace inefectiva la terapia anteriormente eficiente. Los pacientes con hemofilia A con inhibidores son un ejemplo no limitante de una coagulopatía que es parcialmente congénita y parcialmente adquirida. Los pacientes que han desarrollado inhibidores hacia el FVIII no pueden tratarse con la terapia de reemplazo convencional. Los factores de coagulación exógenos solo pueden administrarse por vía intravenosa, lo cual es considerablemente inconveniente e incómodo para los pacientes.

Una formación inadecuada del FXa y una generación disminuida de trombina provocada por la reducción o ausencia de la actividad del FVIII es la razón subyacente de las diátesis hemorrágicas en los pacientes con hemofilia A.

La conversión proteolítica del FX en su forma enzimáticamente activa FXa puede lograrse mediante el complejo intrínseco que activa el FX que comprende el FIXa y su cofactor activado FVIIIa (FVIIIa). La unión del cofactor aumenta la actividad enzimática del FIXa en aproximadamente cinco órdenes de magnitud, y se cree que se produce a través de múltiples mecanismos como se describe por Scheifflinger y otros (2008) *J Thromb Haemost*, 6:315-322. Notablemente, se ha encontrado que el FVIIIa estabiliza una conformación del FIXa que tiene mayor actividad proteolítica hacia el FX (Kolkman JA, Mertens K (2000) *Biochemistry*, 39:7398-7405, Zögg T, Brandstetter H (2009) *Biol Chem*, 390:391-400).

En años recientes, se ha aprobado el emicizumab (HEMLIBRA®), también conocido como ACE910, para el tratamiento profiláctico subcutáneo de la hemofilia A con o sin inhibidores contra los factores de la terapia de reemplazo convencional. El emicizumab es un anticuerpo monoclonal biespecífico de longitud completa anti-FIX(a)/anti-FX(a) humanizado, desarrollado por Chugai Pharmaceuticals/Roche Pharmaceuticals para el tratamiento de la hemofilia A. El emicizumab está diseñado para mimetizar la función de cofactor FVIII (ver Sampei y otros (2013) *PLoS One*, 8, e57479 y el documento WO2012/067176). Se ha especulado que el tratamiento con 30-50 µg de emicizumab por mililitro de plasma corresponde al menos a 10 a 15 UI de actividad equivalente del

factor VIII por decilitro de plasma (Shima y otros, N Engl J Med 2016; 374:2044-53). Sin embargo, algunos pacientes han desarrollado inhibidores (anticuerpos antifármaco) contra emicizumab, lo que hace que el tratamiento con este compuesto sea inefectivo.

Además de la generación de inhibidores como se ejemplifica para emicizumab, otras propiedades de anticuerpos también son importantes para lograr un tratamiento eficaz basado en anticuerpos para el paciente. En particular, se ha demostrado que los anticuerpos con alta propensión a la unión no específica pueden conducir a problemas de seguridad en la clínica. En algunos informes, un alto nivel de unión no específica provocó una reducción de varias veces en la vida media circulante del anticuerpo y condujo a pautas posológicas inefectivas y engorrosas para el paciente (ver Dobson y otros, *Nature*, volumen 6, núm. art.: 38644 (2016) y Avery y otros, *MAbs* 2018, Vol.10, Núm.2, 244–255).

Los documentos WO2018/141863, WO2019/065795 (US10759870), WO2020/025672 y WO2021/152066 describen anticuerpos biespecíficos de longitud completa anti-FIX(a)/anti-FX(a) y su uso como procoagulantes para su uso en el tratamiento de la hemofilia por medio de la administración subcutánea. Uno de estos anticuerpos biespecíficos se designa Mim8 (ver Østergaard H y otros, *Blood*. 2021;138:1258–68 y el documento WO2020/025672).

Sin embargo, aún existen muchas necesidades médicas no satisfechas muy significativas en la comunidad de la hemofilia, en particular, en sujetos con coagulopatías y en particular, existe la necesidad de reducir la carga del tratamiento y mejorar los compuestos capaces de sustituir el FVIII(a) para su uso en el tratamiento de una coagulopatía tal como la hemofilia A y enfermedades relacionadas.

COMPENDIO

La presente invención proporciona derivados de polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) procoagulantes, tales como derivados polipeptídicos V_HH, capaces de unirse al factor de coagulación IX(a) y al factor de coagulación X(a) que son muy potentes y proporcionan una vida media suficientemente larga como para permitir una administración subcutánea así como también una administración peroral efectiva. Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a derivados polipeptídicos de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) procoagulantes que comprenden un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, uno o más restos de prolongación unidos a

uno o más residuos expuestos en la superficie, opcionalmente un enlazador (L_{1-2}) que enlaza ISVD1 e ISVD2, y opcionalmente una o más extensiones (E).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un derivado polipeptídico de ISVD procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma
5 activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, al menos un resto de prolongación unido a un residuo expuesto en la superficie, opcionalmente un enlazador (L_{1-2}) enlazar ISVD1 e ISVD2, y opcionalmente una o más extensiones (E), en donde dicho primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos E224, T225,
10 G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva), y en donde dicho segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 y D179 (numeración consecutiva).

El derivado polipeptídico de ISVD puede ser, por ejemplo, un derivado polipeptídico V_{HH} .

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los derivados polipeptídicos de ISVD como se describe en la presente descripción. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de derivados polipeptídicos de ISVD descritos en la presente descripción y composiciones que comprenden dichos compuestos para el tratamiento de diversas formas de hemofilia y, en particular, hemofilia A, hemofilia A con inhibidores y hemofilia A adquirida por
20 diversas vías de administración, lo que incluye la administración subcutánea y peroral.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al componente individual (intermedio) de ISVD o fragmentos V_{HH} que son parte de un derivado polipeptídico de ISVD o derivado polipeptídico V_{HH} , tal como un fragmento V_{HH} anti-FIX(a) particular o un fragmento V_{HH} anti-FX(a) particular de este. Un aspecto adicional de la invención se refiere a la fabricación de los componentes (intermedios) de
25 los compuestos como se describe en la presente descripción, lo que incluye métodos para modificar el punto isoeléctrico de derivados polipeptídicos de ISVD capaces de unirse a FIX(a) y FX(a) como para mejorar la biodisponibilidad oral de dichos derivados polipeptídicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Las Figuras 1a-f muestran ejemplos no limitantes de derivados polipeptídicos de ISVD anti-FX(a)/FIX(a). E: Extensión, PM: resto de prolongación, L_{1-2} : enlazador que conecta ISVD1 e ISVD2. Las líneas discontinuas indican enlaces disulfuro.

La Figura 2a muestra un ejemplo no limitante de un derivado polipeptídico V_HH anti-FX/FIX(a) que comprende un único resto de prolongación basado en ácido graso diácido C18 conjugado a una extensión C-terminal por medio de un enlazador del resto de prolongación (L_P), ID: L_P1. Las líneas discontinuas indican enlaces disulfuro.

- 5 La Figura 2b muestra un ejemplo no limitante de un derivado polipeptídico V_HH anti-FX/FIX(a) que comprende un único resto de prolongación basado en tetrazol conjugado a una extensión C-terminal por medio de un enlazador del resto de prolongación (L_P), ID: L_P2. Las líneas discontinuas indican enlaces disulfuro.

Las Figuras 3a-f muestran una descripción figurativa detallada de los compuestos cpto #20 (a), cpto #18 (b), cpto #15 (c), cpto #13 (d), cpto #14 (e) y cpto #12 (f), que son ejemplos no limitativos de anti-FX/FIX(a) V_H Derivados polipeptídicos H que comprenden un resto de prolongación basado en ácido graso diácido C16 doble conjugado a una extensión C-terminal (E) por medio de un enlazador de restos de prolongación (L_P), ID L_P1. Las líneas discontinuas indican enlaces disulfuro. La extensión (E) (SEQ NO: 9) se usó en estos derivados polipeptídicos V_HH. La extensión comprende
15 dos residuos de cisteína en las posiciones 4 y 6, respectivamente, que sirven como puntos de acoplamiento para los restos de prolongación (PM).

En a) la secuencia del polipéptido V_HH1.20 - L₁₋₂ - V_HH2.20 - E está representada mediante la SEQ ID NO:634 (cpto #20).

En b) la secuencia del polipéptido V_HH1.18 - L₁₋₂ - V_HH2.18 - E está representada por la SEQ ID
20 NO:632 (cpto #18).

En c) la secuencia del polipéptido V_HH1.15 - L₁₋₂ - V_HH2.15 - E está representada por la SEQ ID NO:629 (cpto #15).

En d) la secuencia del polipéptido V_HH1.13 - L₁₋₂ - V_HH2.13 - E está representada por la SEQ ID NO:627 (cpto #13).

En e) la secuencia del polipéptido V_HH1.14 - L₁₋₂ - V_HH2.14 - E está representada por la SEQ ID
25 NO:628 (cpto #14).

En f) la secuencia del polipéptido V_HH1.12 - L₁₋₂ - V_HH2.12 - E está representada por la SEQ ID NO:626 (cpto #12).

La Figura 4 muestra un ejemplo de curvas de titulación (actividad como resultado de la concentración
30 del compuesto) para el cpto #6, Mim8 y SIA de emicizumab.

Las Figuras 5a y 5b muestran alineaciones de secuencias de las secuencias ISVD anti-FIX(a) y anti-FX (fragmento V_HH), respectivamente, en donde las secuencias de CDR se resaltan en negrita y subrayadas.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La SEQ ID NO:1 representa la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación IX humano.

La SEQ ID NO:2 representa la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación X humano.

Las SEQ ID NO:3-13 y 690 representan las secuencias de aminoácidos de las extensiones (E).

Las SEQ ID NO:14-26 y 691 representan las secuencias de aminoácidos de los enlazadores L₁₋₂ y

10 L_P.

Las SEQ ID NO:27-614 representan las secuencias de aminoácidos de fragmentos V_HH y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de estos.

Las SEQ ID NO:615-691, 734 y 735 representan las secuencias de aminoácidos de polipéptidos V_HH que incluyen cualquier enlazador L₁₋₂ y/o extensiones.

15 Las SEQ ID NO:692-733 representan las secuencias de fragmentos peptídicos como se describe en el Ejemplo 4 en la presente descripción.

Las SEQ ID NO:736-739 representan las secuencias de aminoácidos de los posibles prolongadores.

DESCRIPCIÓN

20 La presente invención proporciona derivados polipeptídicos de ISVD capaces de unirse a FIX(a) y FX(a) que son altamente potentes y proporcionan una vida media suficientemente larga como para permitir una administración subcutánea así como también peroral efectiva. Los derivados polipeptídicos de ISVD descritos en la presente descripción son por tanto adecuados para el tratamiento de diversas formas de hemofilia, tales como hemofilia A, hemofilia A con inhibidores y
25 hemofilia A adquirida por diversas vías de administración, lo que incluye la administración subcutánea y peroral.

En particular, la presente invención se refiere a polipéptidos de ISVD prolongados biespecíficos, tales como polipéptidos V_HH, denominados derivados polipeptídicos de ISVD (o derivados polipeptídicos V_HH), que pueden unirse a FIXa de coagulación y FX de coagulación lo que conduce
30 a la formación de FX de coagulación activado (FXa) de una manera que imita la actividad de cofactor del factor de coagulación VIIIa (FVIIIa). Los derivados polipeptídicos V_HH como se describe en la presente descripción muestran una potencia *in vitro* muy alta, que, por ejemplo, es de órdenes de

magnitud más alta que el análogo de secuencia idéntica (SIA) del anticuerpo biespecífico emicizumab. Los derivados polipeptídicos V_HH también muestran una vida media prolongada a través de prolongadores introducidos, por ejemplo, conjugaciones de ácidos grasos y fusiones de péptidos de unión a albúmina, en modelos animales tales como rata, perro y cerdo. Los polipéptidos V_HH no prolongados muestran un aclaramiento muy rápido en perros y cerdos. Además, los derivados polipeptídicos V_HH se han manipulado por ingeniería genética para permitir una biodisponibilidad clínicamente relevante después de la administración peroral mediante sustituciones de aminoácidos reductores del pI de residuos expuestos en la superficie, y formulaciones mediante el uso de los excipientes N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato de sodio (SNAC) y, por ejemplo, nicotinamida (NAM). Por tanto, tras la administración peroral, los derivados polipeptídicos V_HH formulados y altamente potentes muestran niveles de biodisponibilidad en modelos animales de ratas y perros que son clínicamente relevantes. Hasta ahora, los polipéptidos terapéuticos tales como los derivados polipeptídicos de ISVD, tales como los derivados polipeptídicos V_HH, que tienen un peso molecular de más de 10 kDa, no se han considerado adecuados para la administración peroral. Sin embargo, los derivados polipeptídicos V_HH como se describe en la presente descripción son adecuados para un novedoso tratamiento oral de las coagulopatías, tales como, pero sin limitarse a, la hemofilia A con o sin inhibidores.

La presente invención proporciona por lo tanto derivados de polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) procoagulantes, tales como derivados polipeptídicos V_HH, capaces de unirse al factor de coagulación IX(a) y al factor de coagulación X(a) que son altamente potentes y proporcionan una semivida suficientemente larga para permitir una administración subcutánea eficaz así como también una administración peroral. Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a derivados polipeptídicos de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) procoagulantes que comprenden un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, uno o más restos de prolongación unidos a uno o más residuos expuestos en la superficie, opcionalmente un enlazador (L₁₋₂) que enlaza ISVD1 e ISVD2, y opcionalmente una o más extensiones (E). Las Figuras 1a-f muestran ejemplos no limitantes de derivados polipeptídicos de ISVD anti-FX/FIX(a).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un derivado polipeptídico de ISVD procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma

activada de este, al menos un resto de prolongación unido a un residuo expuesto en la superficie, opcionalmente un enlazador (L_{1-2}) que enlaza ISVD1 e ISVD2, y opcionalmente una o más extensiones (E), en donde dicho primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva), y en donde dicho segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, y L178 y D179 (numeración consecutiva).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante que comprende

un primer V_{HH} (V_{HH1}) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo V_{HH} (V_{HH2}) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2), al menos un resto de prolongación unido a un residuo expuesto en la superficie, opcionalmente un enlazador (L_{1-2}) que enlaza V_{HH1} y V_{HH2} , y

opcionalmente una o más extensiones (E), en donde V_{HH1} comprende la secuencia de

$V_{HH-2.20}$ (SEQ ID NO:171),

$V_{HH-2.18}$ (SEQ ID NO:155),

$V_{HH-2.15}$ (SEQ ID NO:131),

$V_{HH-2.13}$ (SEQ ID NO:115),

$V_{HH-2.14}$ (SEQ ID NO:123),

$V_{HH-2.12}$ (SEQ ID NO:107), o

$V_{HH-2.2}$ (SEQ ID NO:35),

y en donde V_{HH2} comprende la secuencia de

$V_{HH-1.20}$ (SEQ ID NO:167),

$V_{HH-1.18}$ (SEQ ID NO:151),

$V_{HH-1.15}$ (SEQ ID NO:127),

$V_{HH-1.13}$ (SEQ ID NO:111),

$V_{HH-1.14}$ (SEQ ID NO:119),

$V_{HH-1.12}$ (SEQ ID NO:103),

$V_{HH-1.3}$ (SEQ ID NO:31), o

$V_{HH-1.4}$ (SEQ ID NO:39).

En una de tales modalidades, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.20 (SEQ ID NO:167).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.18 (SEQ ID NO:151).

5 En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.15 (SEQ ID NO:127).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.13 (SEQ ID NO:111).

10 En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.12 (SEQ ID NO:103).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.3 (SEQ ID NO:31).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.4 (SEQ ID NO:39).

15 En una de tales modalidades, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.20 (SEQ ID NO:167).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.18 (SEQ ID NO:155) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.18 (SEQ ID NO:151).

20 En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.15 (SEQ ID NO:127).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.13 (SEQ ID NO:111).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.12 (SEQ ID NO:103).

25 En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.3 (SEQ ID NO:31).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.4 (SEQ ID NO:39).

30 En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.15 (SEQ ID NO:131) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.18 (SEQ ID NO:151).

En otra modalidad, V_{HH}H1 comprende la secuencia de V_{HH}H-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_{HH}H2 comprende la secuencia de V_{HH}H-1.15 (SEQ ID NO:127).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).

5 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.3 (SEQ ID NO:31).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.4 (SEQ ID NO:39).

10 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.13 (SEQ ID NO:115) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.18 (SEQ ID NO:151).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.15 (SEQ ID NO:127).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111).

15 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.3 (SEQ ID NO:31).

20 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.4 (SEQ ID NO:39).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.14 (SEQ ID NO:123) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.18 (SEQ ID NO:151).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.15 (SEQ ID NO:127).

25 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).

30 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.3 (SEQ ID NO:31).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.4 (SEQ ID NO:39).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.12 (SEQ ID NO:107) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.18 (SEQ ID NO:151).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.15 (SEQ ID NO:127).

5 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).

10 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.3 (SEQ ID NO:31).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.4 (SEQ ID NO:39).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.2 (SEQ ID NO:135) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.18 (SEQ ID NO:151).

15 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.15 (SEQ ID NO:127).

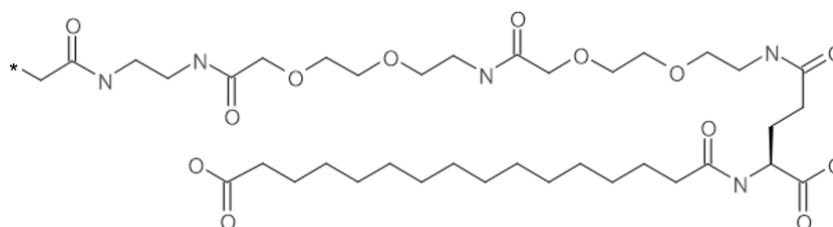
En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111).

20 En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.3 (SEQ ID NO:31).

En otra modalidad, V_HH1 comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171) y V_HH2 comprende la secuencia de V_HH-1.4 (SEQ ID NO:39).

25 En algunas modalidades, el resto de prolongación comprende la siguiente estructura:



30 en donde * designó el punto de acoplamiento en el polipéptido de ISVD.

El derivado polipeptídico de ISVD puede ser, por ejemplo, un derivado polipeptídico V_HH.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los derivados polipeptídicos de ISVD como se describe en la presente descripción. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de derivados polipeptídicos de ISVD descritos en la presente descripción y composiciones que comprenden dichos compuestos para el tratamiento de diversas formas de hemofilia y, en particular, hemofilia A, hemofilia A con inhibidores y hemofilia A adquirida por diversas vías de administración, lo que incluye, pero no se limita a, la administración subcutánea y peroral.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al componente individual (intermedio) de ISVD o fragmentos V_{HH} que son parte de un derivado polipeptídico de ISVD o derivado polipeptídico V_{HH} , tal como un fragmento V_{HH} anti-FIX(a) particular o un fragmento V_{HH} anti-FX(a) particular de este. Un aspecto adicional de la invención se refiere a la fabricación de los componentes (intermedios) de los compuestos como se describe en la presente descripción, lo que incluye métodos para modificar el punto isoeléctrico de derivados polipeptídicos de ISVD capaces de unirse a FIX(a) y FX(a) como para mejorar la biodisponibilidad oral de dichos derivados polipeptídicos.

DEFINICIONES

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen más abajo ciertos términos.

Las letras del alfabeto griego pueden representarse por su símbolo o por el correspondiente nombre escrito, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; etc. También, la letra griega de μ puede representarse por "u", por ejemplo, en $\mu l = ul$, o en $\mu M = uM$.

Un asterisco (*) en una fórmula química designa un punto de acoplamiento.

Se entiende que el término "un" o "una" se refiere a "uno o más." Se entiende que el término "comprender" y variaciones de este, tales como "comprende" y "que comprende", cuando anteceden a la mención de una etapa o un elemento, se refieren a que la adición de etapas o elementos adicionales es opcional y no se excluye.

Se entiende que el término "aproximadamente" se usa en la presente descripción para referirse a aproximadamente, casi o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo al extender los límites por encima y más abajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" puede modificar un valor

numérico por encima y por debajo del valor indicado en un 10 por ciento, por encima o más abajo (mayor o menor).

El término “cadena principal” como se usa en la presente descripción se refiere a una secuencia de aminoácidos del polipéptido de ISVD o polipéptido V_{HH} que incluye cualquier enlazador L_{1-2} y extensión(es), pero excluyendo un resto de prolongación y, para evitar dudas, excluyendo cualquier resto de prolongación adecuado para fusionarse con la cadena principal.

El término “afinidad de unión” es una medida de la fortaleza de una interacción no covalente entre dos moléculas, por ejemplo, un ISVD, tal como un fragmento V_{HH} y un antígeno. El término se usa para describir las interacciones monovalentes. La afinidad de unión entre dos moléculas, por ejemplo, un ISVD, tal como un V_{HH} , a través de una interacción monovalente puede cuantificarse mediante la determinación de la constante de disociación de equilibrio (K_D). La K_D puede determinarse por medición de la cinética de formación y disociación de complejos, por ejemplo, por el método de resonancia de plasmones superficiales (SPR) o el método de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente se denominan como la constante de la tasa de asociación k_a (o k_{on}) y constante de la tasa de disociación k_d (o k_{off}), respectivamente. K_D se relaciona con k_a y k_d a través de la ecuación $K_D = k_d/k_a$.

Al seguir la definición anterior, las afinidades de unión asociadas con diferentes interacciones moleculares, tales como la afinidad de unión de diferentes ISVD por un antígeno dado, pueden compararse mediante la comparación de los valores de K_D de los complejos anticuerpo/antígeno individuales.

El valor de la constante de disociación puede determinarse directamente mediante métodos bien conocidos. Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de ligandos tales como ISVD hacia los objetivos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, inmunoelctrotransferencias, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión y la afinidad de unión del ISVD pueden evaluarse, además, mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como SPR.

Puede realizarse un ensayo de unión competitiva en el que la unión del ISVD, tal como un V_{HH} , al objetivo, se compara con la unión del objetivo en presencia de otro ligando de ese objetivo, tal como otro ISVD.

A menos que el contexto lo contradiga, la K_D se determina preferentemente mediante resonancia de plasmones superficiales como se describe en la presente descripción (ver el ejemplo 7).

Preferentemente, la K_D valor de un ISVD capaz de unirse a FIX(a) es 3 μM o menos, tal como 15 nM o menos, tal como 11.7 nM o menos.

Preferentemente, la K_D valor de un ISVD capaz de unirse a FX(a) es 3 μM o menos, tal como 350 nM o menos, tal como 300 nM o menos.

- 5 Un ISVD (o fragmento V_{HH}) “reactivo entre especies” se une, por ejemplo, a FIX de todas las especies indicadas (por ejemplo, ser humano y macaco cangrejero) con una afinidad comparable, en particular con una K_D en el intervalo de un factor de 100, tal como dentro de un intervalo de un factor de 50, dentro de un intervalo de un factor de 20 o dentro de un intervalo de un factor de 10. Dentro de un intervalo de K_D de un factor X definido significa que la afinidad más alta por una especie
- 10 enumerada particular no es mayor que X veces mayor que la afinidad más baja medida para la unión a una especie enumerada diferente. Un experto en la técnica entenderá que cualquier método para medir la afinidad puede usarse para comprobar que un ISVD reactivo entre especies se une al antígeno objetivo de todas las especies enumeradas dentro de un intervalo de factor de K_D dado como se describe en la presente descripción, siempre que se apliquen las mismas condiciones a la medición
- 15 de la K_D para todas las especies enumeradas. Preferentemente, los valores de K_D se miden mediante el uso de SPR, en particular a 25 °C. Preferentemente, las afinidades se miden mediante el uso del ISVD reactivo entre especies, tal como un V_{HH} .

Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amino y un grupo ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, que se refieren frecuentemente como una cadena

20 lateral.

El término "aminoácido" incluye aminoácidos canónicos (que se codifican genéticamente) y aminoácidos no naturales. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales son Aib (ácido α -aminoisobutírico), deamino histidina (nombre alternativo ácido 3-(imidazol-4-il)propiónico, abreviado Imp (imidazopropionilo) y los d-isómeros de los aminoácidos canónicos. Todos los

25 residuos de aminoácidos dentro del polipéptido para los cuales no se indica el isómero óptico deben entenderse en la presente descripción que significa el l-isómero a menos que se especifique de cualquier otra manera.

El término “anticuerpo” en la presente descripción se refiere a una proteína, que comprende o se deriva de una secuencia de inmunoglobulina, que es capaz de unirse a un antígeno o una porción de

30 este

El término “anticuerpo” incluye, pero no se limita a, anticuerpos de longitud completa que comprenden al menos cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras

(LC) que se conectan por enlaces disulfuro, así como también anticuerpos que comprenden al menos tres cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (HC) y una cadena ligera (LC) que se conectan por enlaces disulfuro. Una clase de inmunoglobulinas son las IgG. En seres humanos, la clase IgG puede dividirse en cuatro subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, en base a la secuencia de sus regiones constantes de cadena pesada. Las cadenas ligeras pueden dividirse en dos tipos, cadenas kappa y lambda, en base a diferencias en su composición de secuencias. Las moléculas de IgG están compuestas por dos cadenas pesadas, enlazadas entre sí por dos o más enlaces disulfuro, y dos cadenas ligeras, cada una unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro. El término “anticuerpo” también abarca anticuerpos de dominio único tales como fragmentos V_HH y fragmentos V-NAR.

El término “región hipervariable”, como se usa en la presente, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende las “regiones determinantes de la complementariedad” también conocidas como las “CDR”.

Las regiones “marco” o “FR” son aquellas regiones de dominio variable que no son los residuos de la región hipervariable. Por tanto, un anticuerpo o ISVD comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La CDR3 de la cadena pesada es la región que típicamente contribuye más a la unión al antígeno.

El término “epítipo” como se usa en la presente significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos generalmente consisten en elementos superficiales de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de agentes desnaturizantes capaces de interrumpir la estructura de la proteína.

En el contexto de una estructura cristalina derivada por rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un ISVD, un fragmento V_HH, y su objetivo, el término epítipo en la presente descripción, a menos que se especifique de cualquier otra manera o se contradiga por el contexto, se define específicamente, como residuos del ISVD que se caracterizan por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å a partir de un átomo pesado en FIX/FIXa o FX/FXa.

El epítopo para un par ISVD/antígeno dado puede identificarse mediante métodos de rutina, tales como los descritos en los ejemplos. Por ejemplo, el ISVD y el antígeno pueden combinarse y el complejo ISVD/antígeno puede cristalizarse. La estructura cristalina del complejo puede determinarse y usarse para identificar sitios específicos de interacción entre el ISVD y su antígeno.

- 5 En una modalidad, un derivado polipeptídico de ISVD como se describe en la presente descripción comprende un primer ISVD capaz de unirse a un epítopo en el FIX o la forma activada de este que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (SEQ ID NO:1) y un segundo ISVD es capaz de unirse a un epítopo en FX (SEQ ID NO:2) que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, 10 L177 y L178 (numeración consecutiva).

En una modalidad, el derivado polipeptídico de ISVD comprende un primer ISVD capaz de unirse a un epítopo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva), y

- 15 un segundo ISVD capaz de unirse a un epítopo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 (numeración consecutiva) o que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 y D179.

- El factor de coagulación IX (FIX) es un factor de coagulación dependiente de la vitamina K con 20 similitudes estructurales con el Factor VII, la protrombina, el Factor X y la proteína C. El FIX circula en el plasma como un zimógeno monocatenario (SEQ ID NO:1). La forma de zimógeno circulante consiste en 415 aminoácidos divididos en cuatro dominios distintos que comprenden un dominio rico en ácido γ -carboxiglutámico (Gla) N-terminal, dos dominios de EGF y un dominio de serina proteasa similar a la tripsina C-terminal. La activación del FIX se produce por proteólisis limitada 25 en Arg145 y Arg180 para liberar el péptido de activación (residuos 146 a 180 de la SEQ ID NO:1). Por tanto, el FIX activado (FIXa) se compone de los residuos 1-145 de la SEQ ID NO:1 (cadena ligera) y los residuos 181-415 de la SEQ ID NO:1 (cadena pesada).

- Por tanto, las moléculas del FIX circulantes comprenden el zimógeno del FIX y la forma activada del FIX que se refieren generalmente en la presente descripción como FIX y FIXa con referencia a 30 la SEQ ID NO:1.

El Factor IX activado se denomina como Factor IXa o FIXa. El término “FIX (SEQ ID NO:1) y/o la forma activada de este (FIXa)” pueden denominarse, además, “FIX/FIXa” o simplemente “FIX(a)”.

FIXa es una serina proteasa similar a la tripsina que cumple un papel clave en la hemostasia mediante la generación, como parte del complejo tenasa, de la mayoría del Factor Xa requerido para respaldar la formación adecuada de trombina durante la coagulación.

El FIX se representa en la presente descripción mediante la SEQ ID NO:1 que corresponde a la forma alélica Ala148 del FIX humano (Anson y otros, EMBO J. 1984 3:1053-1060; McGraw y otros, Proc Natl Acad Sci USA. 1985 82:2847-2851; Graham y otros, Am. J. Hum. Genet. 1988 42:573-580). En la presente invención, FIX está destinado a cubrir todas las variantes naturales del FIX, tal como la variante T148 (ID Uniprot P00740).

El FX es un factor de coagulación dependiente de la vitamina K con similitudes estructurales al Factor VII, la protrombina, el FIX, y la proteína C. El FX circula en el plasma como un zimógeno bicatenario que incluye los residuos 1-139 de la SEQ ID NO:2 (cadena ligera) y los residuos 143-448 de la SEQ ID NO:2 (cadena pesada). El zimógeno del FX humano comprende cuatro dominios distintos que comprenden un dominio rico en ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) N-terminal (residuos 1-45), dos dominios de EGF, EGF1 (residuos 46-82) y EGF2 (residuos 85-125), respectivamente, y un dominio de serina proteasa similar a la tripsina C-terminal (residuos 195-448). La activación del FX se produce por proteólisis limitada en Arg194, lo que da como resultado la liberación del péptido de activación (residuos 143-194). Por tanto, el FX activado (FXa) se compone de los residuos 1-139 de la SEQ ID NO:2 (cadena ligera) y los residuos 195-448 de la SEQ ID NO:2 (cadena pesada activada). Por tanto, las moléculas del Factor X circulantes comprenden el zimógeno FX y la forma activada del FX que se denominan en la presente descripción como FX y FXa, respectivamente, con referencia a la SEQ ID NO:2. En la presente invención, FX pretende cubrir todas las variantes naturales del FX. El término “FX (SEQ ID NO:2) y/o la forma activada de este (FXa)” pueden denominarse, además, como “FX/FXa” o “FX(a)”.

El término “sustitución conservadora” como se usa en la presente, se refiere al caso donde un aminoácido puede sustituirse por un aminoácido con propiedades bioquímicas similares, por ejemplo, un aminoácido básico puede sustituirse por otro aminoácido básico (por ejemplo, lisina por arginina), un aminoácido ácido puede sustituirse por otro aminoácido ácido (por ejemplo, glutamato por aspartato), un aminoácido neutro puede sustituirse por otro aminoácido neutro (por ejemplo, treonina por serina), un aminoácido cargado puede sustituirse por otro aminoácido cargado (por ejemplo, glutamato por lisina), un aminoácido hidrófilo puede sustituirse por otro aminoácido hidrófilo (por ejemplo, asparagina por glutamina), un aminoácido hidrófobo puede sustituirse por otro aminoácido hidrófobo (por ejemplo, alanina por valina), un aminoácido polar puede sustituirse

por otro aminoácido polar (por ejemplo, serina por treonina), un aminoácido aromático puede sustituirse por otro aminoácido aromático (por ejemplo, fenilalanina por triptófano) y un aminoácido alifático puede sustituirse por otro aminoácido alifático (por ejemplo, leucina por isoleucina).

El término "excipiente" como se usa en la presente se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo.

Los ejemplos de excipientes, sin limitación, incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, L-arginina, nicotinamida, SNAC, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

El término "extensión" (E) como se usa en la presente se refiere a un péptido o polipéptido adecuado para unirse a un polipéptido de ISVD.

La extensión puede ser de unos pocos aminoácidos, 1 a 10 aminoácidos, puede ser más larga, 10 a 30 aminoácidos, o puede ser muy larga, más de 30 aminoácidos. Una extensión está presente preferentemente en el extremo N-terminal (extensión N-terminal) o en el extremo C-terminal (extensión C-terminal), o ambos, de un polipéptido de ISVD, derivado polipeptídico de ISVD, polipéptido V_HH o derivado polipeptídico V_HH. Alternativamente, la extensión se une en otro lugar en el polipéptido de ISVD fuera de las secuencias de CDR, tal como en una o más regiones marco o en un enlazador L₁₋₂.

La(s) extensión(ones) se fusiona(n) preferentemente recombinantemente al polipéptido de ISVD. En otras modalidades la(s) extensión(nes) se conjuga(n) al polipéptido de ISVD.

Los ejemplos no limitativos incluyen cpto #22 que tiene una extensión C-terminal de 6 aminoácidos compuesta de GQACPC (SEQ ID NO:9), cpto #6 que tiene una extensión C-terminal de 13 aminoácidos compuesta de GGGGCSCHHHHHH (SEQ ID NO:8), y una extensión C-terminal de 11 aminoácidos compuesta de GGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:7).

El propósito de la extensión es proporcionar un punto de unión para restos de prolongación y/o proporcionar un medio para la purificación. Por lo tanto, el término extensión no abarca los prolongadores y los restos de prolongación.

Por ejemplo, un transportador que incluye cualquier enlazador de transportador (L_P) fusionado de manera recombinante al extremo N- o C-terminal del polipéptido no se considera una extensión.

El término "fusión" como se usa en la presente se refiere a la unión en marco de dos o más secuencias de ADN, que originalmente codifican proteínas o péptidos separados, o fragmentos de estos. La traducción de la secuencia de ADN del polipéptido de fusión dará como resultado una secuencia polipeptídica única, que puede tener propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas

o péptidos originales. Las secuencias de ADN que codifican proteínas de fusión pueden crearse artificialmente mediante métodos de biología molecular estándar tales como PCR solapada o ligadura de ADN. La secuencia de ADN de polipéptidos de fusión resultante puede insertarse en un vector de expresión apropiado que soporte la expresión de proteínas de fusión heterólogas en organismos huéspedes tales como bacterias, levaduras, hongos, células de insectos o células de mamíferos. Los restos de prolongación pueden, por ejemplo, fusionarse al C-terminal o N-terminal de un polipéptido de ISVD o cadena principal polipeptídica V_HH.

El término "célula huésped" como se usa en la presente descripción cubre cualquier tipo de sistema celular que puede manipularse por ingeniería genética para generar los ISVD descritos en la presente descripción. Las células huésped incluyen, pero no se limitan a, células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamíferos, tales como células CHO, células HEK293T, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de hongos y células de insectos. El término "identidad" como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, según se determina mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" significa, además, el grado de relación de las secuencias entre los polipéptidos, según se determina por la cantidad de coincidencias entre las cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el por ciento de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de interrupciones (si corresponde) al que se llega mediante un modelo matemático o programa de computadora particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. En la presente invención, la similitud e identidad se determinaron mediante el uso de Needleman (Needleman y otros, J. Mol. Biol. 1970; 48:443-453) de EMBOSS-6.6.0 mediante el uso de los parámetros 10 y 0.5 para la apertura y extensiones de las interrupciones, respectivamente (gapopen=10, gapextend=0.5).

El término "dominio variable único de inmunoglobulina" o "ISVD" se usa como un término general para incluir dominios o fragmentos de unión a antígeno tales como dominios V_H y V_L, respectivamente.

Por tanto, el ISVD puede ser una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (por ejemplo, una secuencia V_L) o una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (por ejemplo, una secuencia V_H); por ejemplo, una secuencia de dominio variable de la cadena pesada que se deriva

de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas o una secuencia de dominio variable de la cadena ligera que se deriva de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas.

Un tipo particular de ISVD es un fragmento V_HH que se identificó originalmente como un tipo de inmunoglobulina definido como un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio único de anticuerpo variable monomérico. Un fragmento V_HH es un anticuerpo de dominio único que abarca la región variable de unión al antígeno de los anticuerpos de solo cadena pesada, que puede obtenerse de los camélidos. Los fragmentos V_HH tienen un tamaño de alrededor de 15 kDa. Contienen una molécula monocatenaria que puede unirse a su antígeno cognado mediante el uso de un solo dominio. Las superficies de unión al antígeno de los fragmentos V_HH son generalmente más convexas (o sobresalientes) que las de los anticuerpos convencionales, que son generalmente planas o cóncavas. Los fragmentos V_HH se componen de cuatro regiones marco (o FR) cuyas secuencias y estructuras se definen como conservadas, y tres regiones determinantes de la complementariedad (o CDR) que muestran una alta variabilidad tanto en el contenido de la secuencia como en la conformación de la estructura, que están involucradas en la unión al antígeno y proporcionan especificidad por el antígeno.

Otro tipo de ISVD puede obtenerse de IgNAR de pescado cartilaginoso y un anticuerpo de dominio único de este se designa como un “fragmento V-NAR”.

Los fragmentos V_HH y V-NAR no comprenden dominios constantes y, por lo tanto, no tienen región Fc, que típicamente forma parte de anticuerpos de solo cadena pesada parciales/de longitud completa y/o manipulados por ingeniería genética/naturales [Dooley y otros (2006) Dev. Comp. Immunol. 30:43–56; Muyldermans S. (2013) Annu Rev Biochem. 82:775-97].

Una descripción general de fragmentos V_HH de camélidos y métodos para su producción y/o aislamiento y/o uso se encuentran entre otros en las siguientes referencias WO94/04678 y WO97/49805. Una descripción general de las inmunoglobulinas de cadena pesada de pescado cartilaginoso y las regiones variables de estas y los métodos para su producción y/o aislamiento y/o uso se encuentra entre otros en el documento WO2005/118629.

El número total de residuos de aminoácidos en un fragmento V_HH está típicamente en el intervalo de 110-140. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las partes, fragmentos o análogos de un V_HH no están limitadas particularmente en cuanto a su longitud y/o tamaño, si dichas partes, fragmentos o análogos cumplen con los requisitos adicionales descritos a continuación y también son preferentemente adecuadas para los propósitos descritos en la presente descripción. El peso molecular de un fragmento V_HH está típicamente en el intervalo de 12-15 kDa. El pI para los

fragmentos V_HH es generalmente básico, como lo son generalmente los anticuerpos, lo que significa que los valores de pI están generalmente por encima de 7, a menudo entre 7.5 y 8.5. Un fragmento V_HH generalmente abarca al menos un puente disulfuro formado típicamente por pares de cisteína conservados colocados en las regiones marco 1 y 3. Tal(es) puente(s) disulfuro(s) garantiza(n) el plegamiento y la estabilidad correctos del fragmento V_HH, y es conveniente conservar tal puente disulfuro(s), si, por ejemplo, las modificaciones y/o conjugaciones de la cadena lateral se realizan de tal manera que se dirigen a una cisteína(s) no apareada(s) introducida(s) en un polipéptido V_HH. En el presente documento, las secuencias de CDR de ISVD tales como fragmentos V_HH se determinan mediante el uso de la definición de Kabat (Kontermann y Dübel, 2010, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Capítulo 3, págs. 33-51). De acuerdo con este método, las CDR del dominio variable se definen como la posición 31-35 (CDR1), la posición 50-65 (CDR2) y la posición 95-102 (CDR3). Sin embargo, cuando se hace referencia a posiciones de residuos de aminoácidos específicos en los compuestos polipeptídicos descritos en la presente descripción que incluyen las CDR y las regiones marco (FR) en los polipéptidos de ISVD o polipéptidos V_HH se usa numeración consecutiva a menos que se indique de cualquier otra manera. El término "polipéptido de ISVD" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que comprende dos o más ISVD, tal como un primer ISVD (ISVD1) y un segundo ISVD (ISVD2), por ejemplo, conectado por un enlazador (L₁₋₂) de cualquier composición y longitud apropiadas según sea necesario o sin ningún enlazador en absoluto como una fusión de dominio directo.

El término "enlazador" como se usa en la presente se refiere al menos a un átomo que forma un enlace covalente entre entidades químicas. Si las entidades químicas se enlazan únicamente a través de enlaces peptídicos, el enlazador puede denominarse como un "enlazador peptídico". De cualquier otra manera, el enlazador puede denominarse como un "enlazador químico".

Un ejemplo de un polipéptido de ISVD son dos ISVD conectados a través de un enlazador (L₁₋₂).

Otro ejemplo de un polipéptido de ISVD son dos ISVD conectados a través de un enlazador (L₁₋₂) que comprende además una o más extensiones.

Otro ejemplo de un polipéptido de ISVD son dos ISVD conectados sin un enlazador (L₁₋₂) y que comprende además una o más extensiones, tales como, pero sin limitarse a, una extensión C-terminal y/o N-terminal.

El enlazador (L₁₋₂) puede estar compuesto, por ejemplo, de una secuencia de aminoácidos, que comprende ninguna o múltiples repeticiones.

Por ejemplo, un enlazador puede comprender de 2 a 50 aminoácidos, de 5 a 40 aminoácidos o de 10 a 30 aminoácidos.

Los ejemplos no limitantes de enlazadores incluyen enlazador *-GGGGS-*, enlazador *-GQAPGQ-* (SEQ ID NO:20), enlazador *-QAPGQA-* (SEQ ID NO:16), enlazador *-GI-*, enlazador *-GV-*, enlazador *-GT-*, enlazador *-GL-* u otro enlazador compuesto de aminoácidos. Dos ejemplos de enlazadores son compuestos de repeticiones x2 y x6 de GGGGS, que son de 10 y 30 residuos de aminoácidos de longitud, respectivamente.

Para evitar dudas, el subíndice ₁₋₂ en L₁₋₂ no implica que se enlace una dirección particular de los ISVD, es decir, un L₁₋₂ puede, por ejemplo, enlazar ISVD1 a ISVD2, o ISVD2 a ISVD1 (N- a C-terminal).

Las SEQ ID NO:14-24 representan ejemplos no limitantes de enlazadores L₁₋₂.

En alguna modalidad, el polipéptido de ISVD comprende una extensión (E) como se describe en cualquiera de las fórmulas más abajo.

ISVD1 – ISVD2, o

ISVD1 – ISVD2 – E, o

ISVD2 – ISVD1 – E, o

E - ISVD1 - ISVD2, o

ISVD1 – L₁₋₂ – ISVD2 – E, o

ISVD2 – L₁₋₂ – ISVD1 – E, o

E - ISVD1 – L₁₋₂ – ISVD2,

La extensión (E) puede unirse, por ejemplo, a un polipéptido de ISVD como se describe en cualquiera de las fórmulas más abajo (N- a C-terminal):

ISVD1 – ISVD2, o

ISVD1 – ISVD2 – E, o

ISVD2 – ISVD1 – E, o

E - ISVD1 - ISVD2, o

ISVD1 – L₁₋₂ – ISVD2 – E, o

ISVD2 – L₁₋₂ – ISVD1 – E, o

E - ISVD1 – L₁₋₂ – ISVD2

Un polipéptido de ISVD comprende preferentemente un resto de prolongación. En dichos casos, el polipéptido de ISVD se denomina derivado polipeptídico de ISVD.

En algunas modalidades, el primer ISVD sirve como punto de acoplamiento para uno o más restos de prolongación.

En algunas modalidades, el segundo ISVD sirve como punto de acoplamiento para uno o más restos de prolongación.

- 5 En algunas modalidades, el enlazador L_{1-2} sirve como punto de acoplamiento para uno o más restos de prolongación.

Para evitar dudas, cuando un resto de prolongación incluye un enlazador (L_P) unido a una extensión (E) a un ISVD1- L_{1-2} -ISVD2, el enlazador L_P no se considera parte de la “extensión”.

- 10 En algunos aspectos, los polipéptidos de ISVD se conjugan químicamente con un no ISVD, por ejemplo, una molécula no polipeptídica química pequeña, un carbohidrato, un ácido graso u oligopeptídico o polipéptido o una proteína, tal como un anticuerpo o preferentemente un fragmento de anticuerpo.

En una modalidad, un polipéptido de ISVD se conecta a un dominio Fc de un anticuerpo IgG sin el uso de un enlazador.

- 15 En otra modalidad, un polipéptido de ISVD se conecta a un dominio Fc o fragmento de este de un anticuerpo IgG mediante un enlazador.

En modalidades preferidas, la(s) extensión(ones) se fusiona(n) con el polipéptido de ISVD y, por tanto, no se conecta(n) al polipéptido de ISVD por medio de conjugación química.

- 20 En algunas modalidades el(los) resto(s) de prolongación se fusiona(n) con el polipéptido de ISVD y, por tanto, no se conectan al polipéptido de ISVD por medio de conjugación química.

- El término “punto isoelectrico” o “pI” como se usa en la presente se refiere al valor de pH donde la carga neta total de una proteína, tal como un anticuerpo, es cero. En las proteínas puede haber muchos grupos cargados y en el punto isoelectrico la suma de todas estas cargas es cero. A un pH por encima del punto isoelectrico, la carga neta total de la proteína será negativa, mientras que a valores de pH por debajo del punto isoelectrico, la carga neta total de la proteína será positiva.

El pI puede ser un punto isoelectrico teórico o uno determinado experimentalmente.

- El experto en la técnica conoce los métodos para determinar el punto isoelectrico de una proteína. Más comúnmente, el punto isoelectrico de una proteína se calcula basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Están disponibles numerosas herramientas (en línea) que permiten la determinación del punto isoelectrico de una proteína, tales como "ExPASy Compute pI/Mw"; ver Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; (In) John M. Walker (ed): The

Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), págs. 571-607. Preferentemente, el algoritmo de Skoog & Wichman, 1986. La pKa de residuos de aminoácidos se usa para calcular el pI.

El pI también puede determinarse experimentalmente y las variantes de carga pueden separarse, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de separación basadas en carga tales como electroforesis en gel de isoelectroenfoque (IEF) o electroforesis en gel de isoelectroenfoque capilar (cIEF).

En una modalidad, el primer y segundo ISVD en un polipéptido de ISVD son fragmentos V-NAR y dichos compuestos se designan como “polipéptidos V-NAR”.

En otra modalidad, el primer y segundo ISVD en un polipéptido de ISVD son fragmentos V_HH y dichos compuestos se designan como “polipéptidos V_HH”. En una de dichas modalidades, el primer fragmento V_HH es capaz de unirse a FIX/FIXa y el segundo fragmento V_HH es capaz de unirse al FX/FXa. En una modalidad preferida, el polipéptido V_HH es un polipéptido V_HH biespecífico.

Para evitar dudas, los términos multi-, tri- y biespecíficos pretenden reflejar el número de antígenos unidos por los ISVD, tales como fragmentos V_HH, es decir, sin incluir moléculas unidas mediante un resto de prolongación (si está presente), tal como, pero sin limitarse a, la albúmina.

En una modalidad, el peso molecular de un polipéptido V_HH sin un resto de prolongación está en el intervalo de 27 a 29 kDa.

En modalidades preferidas el peso molecular de un polipéptido V_HH que incluye uno o más restos de prolongación (un derivado polipeptídico V_HH) y opcionalmente una o más extensiones está en el intervalo de 28 a 33 kDa.

Un experto en la técnica apreciará que las modalidades anteriores son aplicables de manera similar a los polipéptidos V-NAR.

El término “cisteína libre” como se usa en la presente es un residuo de cisteína en una cadena polipeptídica que está disponible para la reacción, por ejemplo, conjugación química y, por tanto, no es parte de un puente disulfuro interno natural o manipulado por ingeniería genética. En esencia, las cisteínas libres pueden usarse para la conjugación, aunque los residuos de cisteína libres, lo que incluye cisteínas libres introducidas recombinantemente, a menudo se bloquean con tioles pequeños, tales como cisteína, homocisteína o glutatión, durante la expresión recombinante de polipéptidos en células huésped. Esto también se observa en la producción recombinante de polipéptidos de ISVD en donde se ha/han introducido una o más cisteínas libres. Por tanto, una reacción de reducción mediante el uso de un agente reductor adecuado, tal como bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dihidratada o clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina, puede usarse para liberar y preparar la cisteína

libre para su conjugación a un resto de interés, tal como, pero sin limitarse a, un resto de prolongación, tal como un resto de ácido graso diácido C18 gamma-Glu 2xOEG.

Los polipéptidos de ISVD, tales como un polipéptido V_HH, como se describe en la presente descripción pueden ser multiespecíficos tales como, pero sin limitarse a, biespecíficos o triespecíficos.

Los términos “polipéptido de ISVD biespecífico” o “polipéptido V_HH biespecífico” como se usa en la presente, se refieren a un polipéptido de ISVD o un polipéptido V_HH, respectivamente, que es capaz de unirse a dos antígenos diferentes o dos epítomos diferentes en el mismo antígeno.

Los términos “polipéptido de ISVD triespecífico” o “polipéptido V_HH triespecífico” como se usa en la presente, se refieren a un polipéptido de ISVD o un polipéptido V_HH, respectivamente, que es capaz de unirse a tres antígenos diferentes o tres epítomos diferentes en el mismo antígeno o tres epítomos diferentes presentes en dos antígenos diferentes.

Los términos “polipéptido de ISVD multiespecífico” o “polipéptido V_HH multiespecífico” como se usa en la presente, se refieren a un polipéptido de ISVD o un polipéptido V_HH, respectivamente, que es capaz de unirse a dos o más antígenos diferentes o dos o más epítomos diferentes en el mismo antígeno. Los polipéptidos de ISVD multiespecíficos o polipéptidos V_HH multiespecíficos comprenden, por tanto, polipéptidos de ISVD o polipéptidos V_HH bi y triespecíficos, respectivamente.

Un experto en la técnica apreciará que lo anterior también se aplica a derivados polipeptídicos (es decir, que incluyen un resto de prolongación).

El término "biodisponibilidad oral" o "biodisponibilidad peroral" como se usa en la presente se refiere a la cantidad de fármaco administrado en la circulación sistémica después de la administración peroral (estimada como el área bajo la curva de concentración plasmática del fármaco administrado en función del tiempo) con relación a la cantidad de fármaco administrado en la circulación sistémica después de la administración intravenosa de dicho fármaco.

El término “parátopo” como se usa aquí se refiere al área o región en el ISVD al que se une específicamente un antígeno, es decir, a la que hace contacto físico con el antígeno.

En el contexto de una estructura cristalina derivada por rayos X, definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un ISVD, un fragmento V_HH, y su objetivo, el término parátopo se define específicamente en la presente descripción, a menos que se especifique de cualquier otra manera o se diga lo contrario según el contexto, como residuos de ISVD caracterizados por tener un átomo

pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å de un átomo pesado en el FIX/FIXa o FX/FXa.

El parátipo (y epítipo) para un par ISVD/antígeno dado puede identificarse mediante métodos de rutina, tales como los descritos en los ejemplos. Por ejemplo, el ISVD y el antígeno pueden combinarse y el complejo ISVD/antígeno puede cristalizarse. La estructura cristalina del complejo puede determinarse y usarse para identificar sitios específicos de interacción entre el ISVD y su antígeno.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica e incluye excipientes que son aceptables para el uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser, por ejemplo, sólidos, líquidos o semisólidos.

El término "vida media en plasma" como se usa en la presente se refiere al tiempo requerido para que la mitad de la cantidad de una sustancia administrada a un paciente se metabolice o elimine del suero o plasma del paciente mediante procesos biológicos normales.

El término "se une preferentemente" como se usa en la presente se entenderá que significa que una región de unión en el ISVD, tal como un fragmento V_HH , se une a un componente (por ejemplo, FIX activado) con preferencia a, o a favor de, otro componente. Como tal, la "unión preferencial" no requiere necesariamente una unión exclusiva o unión no detectable del otro componente. Por ejemplo, un ISVD anti-FIX(a), tal como un fragmento V_HH anti-FIX(a), puede unirse preferentemente al FIX activado en comparación con el FIX no activado.

El término "anticuerpo procoagulante" se refiere a un anticuerpo que potencia la coagulación de la sangre, por ejemplo, mediante la aceleración del proceso de coagulación de la sangre y/o mediante el aumento de la actividad enzimática de uno o más factores de coagulación.

El término "actividad procoagulante" como se usa en la presente se refiere a la capacidad de un compuesto, tal como un anticuerpo, para potenciar la coagulación de la sangre, por ejemplo, mediante la aceleración del proceso de coagulación de la sangre y/o mediante el aumento de la actividad enzimática de uno o más factores de coagulación. En consecuencia, el término "actividad procoagulante" abarca (pero no se limita a) una o más de las actividades enumeradas más abajo:

Potenciación de la activación del Factor X mediada por el Factor IXa, medida mediante un ensayo amidolítico (cromogénico o fluorogénico) basado en la activación de FX mediada por FIXa. El ensayo mide FIXa a través de la escisión de un sustrato peptídico específico de FIXa. Se produce el sustrato, lo que da un color que puede medirse fotométricamente mediante la absorbancia.

El acortamiento de los tiempos de coagulación, medido mediante ensayos de coagulación tales como el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), mide la actividad de las vías intrínseca y común de la coagulación. El plasma se preincuba con un reactivo de APTT que contiene un activador de contacto, por ejemplo, ácido elágico o caolín, y fosfolípido. Se añade cloruro de calcio para promover la formación de coágulos de fibrina. Las lecturas posibles son el tiempo de coagulación o la forma de onda del coágulo.

Potenciación de la generación de trombina, medida en un ensayo de generación de trombina tal como la trombografía automatizada calibrada (CAT). El trombograma describe la concentración de trombina en la coagulación del plasma y, por lo tanto, es una prueba funcional del sistema hemostático. El ensayo se basa en la medición de la fluorescencia que se genera por la escisión del sustrato fluorogénico Z G G R AMC por la trombina a lo largo del tiempo. Ver también el método como se usa en el ejemplo 8 en la presente descripción.

Potenciación de las propiedades viscoelásticas globales de la formación de coágulos medida mediante métodos hemostáticos viscoelásticos, por ejemplo, en sangre total bajo estrés de cizallamiento mediante ensayos tales como ROTEM (tromboelastometría rotacional). En el instrumento, un pasador de cojinete de bolas gira en una copa estacionaria. Las hebras de fibrina de la muestra que se forman entre la pared de la copa y el pasador durante la coagulación y la resistencia de las hebras afectarán al movimiento del pasador, que se detecta.

Reducción del tiempo de cierre de sangre total (WBCT), medido mediante un analizador de la función plaquetaria, que se basa en la adhesión plaquetaria al colágeno mediada por el factor de Von Willebrand (VWF) después de la activación plaquetaria. Se produce un alto estrés de cizallamiento que conduce a la adhesión plaquetaria y a la agregación plaquetaria. Se mide el tiempo desde el inicio hasta el final del flujo sanguíneo.

Los polipéptidos de ISVD descritos en la presente descripción comprenden preferentemente uno, dos, tres o cuatro “restos de prolongación” (PM). Con mayor preferencia, uno o dos restos de prolongación.

El término “resto de prolongación” como se usa en la presente se refiere a un resto que tiene propiedades de extensión de la vida media y que comprende un “prolongador” (P) y un “enlazador” opcional (L_P). El término “prolongación” se refiere por tanto a la extensión de la vida media y un resto prolongador o de prolongación sirve por tanto para el propósito de extender la vida media de los polipéptidos de ISVD descritos en la presente descripción.

Un resto de prolongación (PM) comprende un prolongador “P” y un enlazador opcional (L_P).

Cada resto de prolongación se une preferentemente a un residuo de lisina o cisteína expuesto en la superficie en la cadena principal polipeptídica del compuesto. El punto de acoplamiento se denomina generalmente R1 (y en caso de unión de más de un resto de prolongación R2, R3, etcétera, en donde $R1 \neq R2 \neq R3$, etcétera).

- 5 El experto será capaz de identificar otro(s) residuo(s) expuesto(s) en la superficie adecuado(s) para la unión.

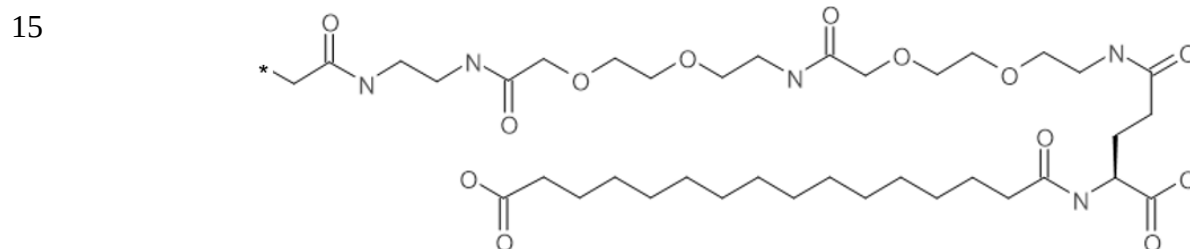
Un resto de prolongación puede consistir en un prolongador.

Un resto de prolongación puede comprender un enlazador (L_P) y un prolongador (P).

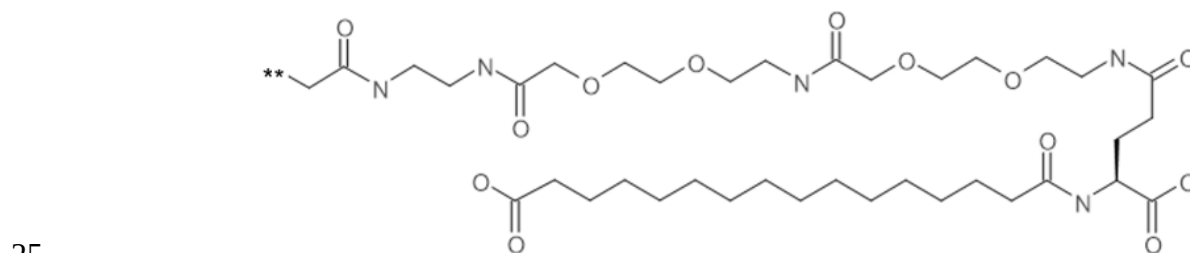
Un resto de prolongación puede comprender un enlazador y dos o más prolongadores.

- 10 Cuando el enlazador (L_P) está presente, el resto de prolongación se une a la cadena principal polipeptídica de ISVD a través del L_P . Cuando el enlazador (L_P) está ausente, P se une a la cadena principal polipeptídica.

En una modalidad, están presentes un primer y un segundo resto de prolongación, en donde dicho primer resto de prolongación comprende la estructura:



- 20 y en donde dicho segundo resto de prolongación comprende la estructura



en donde ‘*’ (R1) representa el punto de acoplamiento en el polipéptido de ISVD para el primer resto de prolongación, y

en donde ‘**’ (R2) representa el punto de acoplamiento en el polipéptido de ISVD para el segundo resto de prolongación,

- 30 en donde ‘*’ es Cys en la posición 257 de SEQ ID NO:629, y

en donde ‘**’ es Cys en la posición 259 de SEQ ID NO:629.

El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender un único residuo de cisteína o lisina, al cual se une/conjuga un único resto de prolongación.

El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender dos residuos de lisina y dos restos de prolongación.

- 5 El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender dos residuos de lisina y dos restos de prolongación idénticos.

El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender dos residuos de lisina y dos restos de prolongación no idénticos.

- 10 El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender tres residuos de lisina y tres restos de prolongación.

El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender tres residuos de lisina y tres restos de prolongación idénticos.

- 15 El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender tres residuos de lisina y tres restos de prolongación no idénticos (por ejemplo, el primer y segundo restos de prolongación pueden ser idénticos y el tercer resto de prolongación puede ser diferente de dicho primer y segundo restos)

El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender dos residuos de cisteína y dos restos de prolongación.

- 20 El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender dos residuos de cisteína y dos restos de prolongación idénticos.

El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender dos residuos de cisteína y dos restos de prolongación no idénticos.

- 25 El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender tres residuos de cisteína y tres restos de prolongación.

El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender tres residuos de cisteína y tres restos de prolongación idénticos.

- 30 El polipéptido de ISVD descrito en la presente descripción puede comprender tres residuos de cisteína y tres restos de prolongación no idénticos (por ejemplo, el primer y segundo restos de prolongación pueden ser idénticos y el tercer resto de prolongación puede ser diferente de dicho primer y segundo restos).

Donde el polipéptido de ISVD comprende dos o tres restos de prolongación, los restos de prolongación son preferentemente similares, con mayor preferencia, sustancialmente idénticos, o,

con la máxima preferencia, idénticos.

En el contexto de los restos químicos tales como los restos de prolongación que se describen en la presente descripción, la similitud y/o identidad pueden determinarse mediante el uso de cualquier programa de computadora adecuado y/o algoritmo conocido en la técnica.

- 5 Los compuestos que comprenden un resto de prolongación pueden denominarse “derivados”. Por ejemplo, se entiende que un “derivado polipeptídico de ISVD” es un polipéptido de ISVD que comprende un resto de prolongación, un “derivado polipeptídico V_HH” un polipéptido V_HH que comprende un resto de prolongación, y un “derivado polipeptídico V-NAR” un polipéptido V-NAR que comprende un resto de prolongación.
- 10 El resto de prolongación puede ser capaz de unirse no covalentemente a la albúmina, lo que promueve de esta manera la circulación del derivado polipeptídico de ISVD en el torrente sanguíneo y prolonga su vida media. Por tanto, en una modalidad, el resto de prolongación es un resto de unión a albúmina.
- El prolongador (P) puede comprender un grupo acilo. El grupo acilo puede ser ramificado o no ramificado. El grupo acilo puede ser saturado o insaturado. El prolongador puede comprender un grupo acilo graso. El grupo acilo puede ser ramificado o no ramificado. El grupo acilo puede ser saturado o insaturado.
- El prolongador puede comprender un grupo ácido carboxílico distal.
- El prolongador puede comprender un grupo ácido graso.
- 20 El prolongador puede comprender un grupo ácido graso y un grupo amida.
- El prolongador puede comprender un grupo ácido carboxílico distal y un grupo amida.
- El prolongador puede comprender un grupo alquilo.
- El prolongador puede comprender un grupo arilo.
- El prolongador puede comprender un grupo tetrazol.
- 25 El prolongador puede comprender un grupo ácido sulfónico.
- El prolongador puede comprender un grupo fenoxi.
- El prolongador puede comprender un grupo ácido benzoico.
- El prolongador puede comprender 8-30 átomos de carbono. El prolongador puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos de carbono.
- 30 El prolongador puede comprender 6-30 grupos -CH₂- consecutivos. El prolongador puede comprender una cadena de carbono que comprende al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 grupos -CH₂-consecutivos.

El prolongador puede comprender 12-26 átomos de carbono. El “prolongador” puede comprender 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 átomos de carbono.

El prolongador puede comprender 10-26 grupos -CH₂- consecutivos. El prolongador puede comprender una cadena de carbono que comprende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 grupos -CH₂- consecutivos.

El prolongador puede comprender 16-22 átomos de carbono.

El prolongador puede comprender 14-20 grupos -CH₂- consecutivos. El prolongador puede comprender una cadena de carbono que comprende 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 grupos -CH₂- consecutivos.

El prolongador puede comprender 16-22 átomos de carbono consecutivos y 14-20 grupos -CH₂- consecutivos.

El prolongador puede comprender 16 átomos de carbono consecutivos y 14 grupos -CH₂- consecutivos.

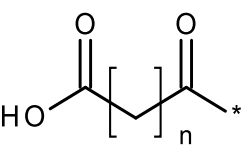
El prolongador puede comprender 18 átomos de carbono consecutivos y 16 grupos -CH₂- consecutivos.

El prolongador puede comprender 20 átomos de carbono consecutivos y 18 grupos -CH₂- consecutivos.

El prolongador puede comprender 22 átomos de carbono consecutivos y 20 grupos -CH₂- consecutivos.

En algunas modalidades, el prolongador comprende un grupo definido por:

Quím. a: HOOC-(CH₂)_n-CO-* en donde n es un número entero en el intervalo de 8-30, que también puede denominarse como un diácido C(n+2) o como

Quím. a1: , en donde n es un número entero en el intervalo de 8-30.

El prolongador puede comprender un oligopéptido. En una modalidad, el oligopéptido prolongador tiene 10 a 40 aminoácidos, tal como 10 a 30 aminoácidos, tal como 15 a 25 aminoácidos, y, preferentemente, 20 aminoácidos. La composición de secuencia del oligopeptido prolongador puede ser, por ejemplo, QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO:736), ejemplificada como secuencia de fusión en SEQ ID NO:3 y 4 [ver también WO01/45746 A2]. El cpto #71 – por ejemplo - comprende un resto de prolongación N-terminal de 50 aminoácidos compuesto por

QRLMEDICLPRWGCLWEDDFGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4) en donde los residuos 1-20 son el prolongador (P) y los residuos 21-50 son el enlazador (L_P).

El prolongador puede unirse al polipéptido de ISVD o ISVD mediante un enlazador de aminoácidos L_P.

- 5 En una modalidad, el L_P puede unir el prolongador (P) a la cadena lateral de un residuo de lisina o cisteína en la cadena principal polipeptídica de ISVD.

El derivado polipeptídico de ISVD puede comprender dos restos de prolongación, cada uno de las cuales comprende 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. El polipéptido de ISVD puede comprender dos restos de prolongación, en donde cada prolongador (P) comprende 12, 13, 14, 15, 10 16, 17 u 18 grupos -CH₂- consecutivos.

El derivado polipeptídico de ISVD puede comprender dos diácidos C14, dos diácidos C16 o dos diácidos C18.

- El derivado polipeptídico de ISVD puede comprender tres restos de prolongación, cada uno de los cuales comprende un prolongador que comprende 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de 15 carbono. El polipéptido de ISVD puede comprender tres restos de prolongación, en donde el prolongador comprende 10, 11, 12 13, 14, 15, 16, 17 o 18 grupos -CH₂- consecutivos.

Para evitar dudas, un resto de prolongación, incluso si es capaz de unirse, por ejemplo, a la albúmina, no se considera un aglutinante en términos de definir si un polipéptido de ISVD como se describe en la presente descripción es bi-, tri- o multispecífico.

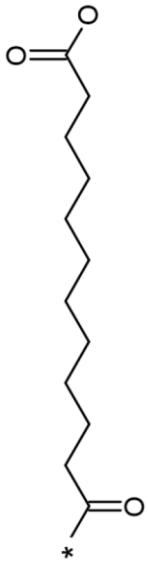
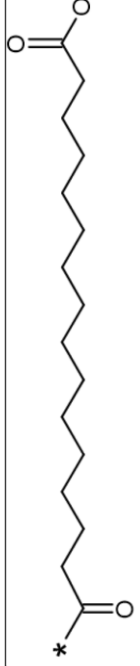
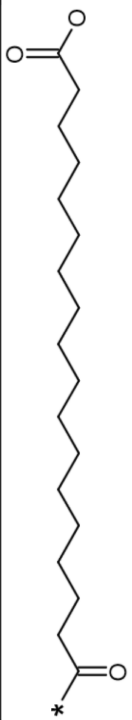
- 20 En algunas modalidades, un polipéptido de ISVD como se describe en la presente descripción puede comprender un prolongador que se selecciona de cualquiera de los representados en la Tabla 1.

En la Tabla 2, L_P representa el enlazador opcional que conecta el prolongador representado (P) a la cadena principal polipeptídica de ISVD. R1 representa el sitio de unión en el polipéptido de ISVD.

25

30

Tabla 1: Ejemplos de prolongadores (P) ('*' representa el punto de unión a L_P o R₁)

ID del prolongador	Estructura	Usado en compuestos
P1	 Diácido C12	Cpto #65
P2	 Diácido C16	Cpto #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #21, #22
P3	 Diácido C18	Cpto #4, #5, #24, #26, #28, #30, #32, #34, #36, #38, #40, #58, #59, #60, #61, #62, #63, #66

5

10

15

20

25

30

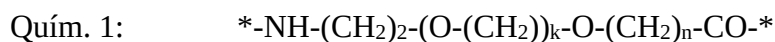
P4	 Diácido C20	Cpto #67
P5	 Tetrazol	Cpto #68
P6	QRLMEDICLPRWGCLWEDDF Oligopéptido de unión a albúmina, ejemplificado como secuencia de fusión en las SEQ ID NO:3 y 4. La SEQ ID NO:3 describe el oligopéptido aglutinante de albúmina junto con un enlazador de glicina-serina de 10 aminoácidos, mientras que la SEQ ID NO:4 describe el oligopéptido aglutinante de albúmina junto con un enlazador de glicina-serina de 30 aminoácidos.	Cpto #70, #71, #72, #73

En una modalidad, el prolongador se conjuga directamente sobre el polipéptido de ISVD, es decir, sin el uso de un enlazador L_P (es decir, por medio de un enlace covalente).

En otras modalidades, el prolongador se conjuga directamente sobre el polipéptido de ISVD mediante el uso de un enlazador L_P . Más abajo se proporcionan ejemplos no limitantes.

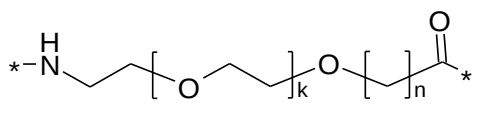
- 5 El enlazador L_P , cuando está presente, puede comprender Ado, Aeep o Aeep, sulfonamida, Trx, ϵ -Lys, Ahx, Glu, γ Glu, Gly, Ser, Ala, y/o Thr.

El enlazador L_P puede comprender al menos un resto que puede representarse mediante la siguiente fórmula química:



10 o

Quím. 2:



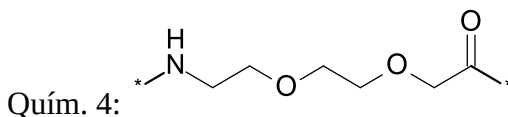
15

en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

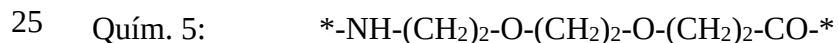
Cuando k=1 y n=1, el elemento enlazador puede designarse Ado, o 8-amino-3,6-dioxaoctanoilo, que puede representarse mediante la siguiente fórmula química:



20 o

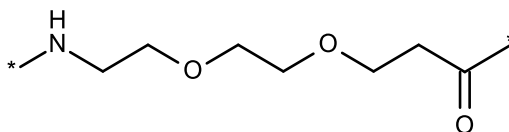


Cuando k=1 y n=2, el elemento enlazador puede designarse Aeep, que puede representarse mediante la siguiente fórmula química:



o

Quím. 6:



30

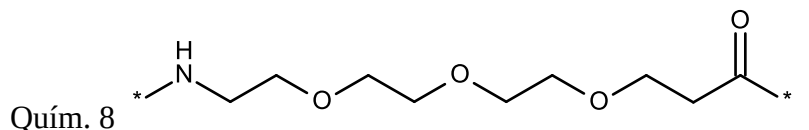
Cuando k=2 y n=2, el elemento enlazador puede designarse Aeep, que puede representarse

mediante la siguiente fórmula química:

Quím. 7: $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}^*$

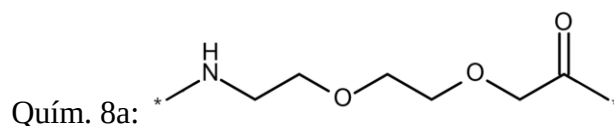
o

5



El enlazador opcional (L_P) puede comprender un grupo ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico (OEG) que tiene la siguiente fórmula química

10

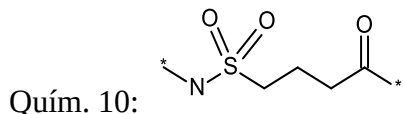


El enlazador opcional (L_P) puede comprender un resto sulfonamida-C4. Un grupo sulfonamida-C4 es un grupo sulfonamida unido a un grupo 4-butanoilo, que tiene la siguiente fórmula química:

Quím. 9: $^*\text{-NH-S(O)}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}^*$

o

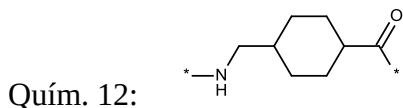
15



El enlazador opcional L_P puede comprender Trx. Trx también se denomina como ácido tranexámico, ácido trans-4-(aminometil)ciclohexanocarboxílico, que tiene la siguiente fórmula química:

20 Quím. 11: $^*\text{-NH-CH}_2\text{-(C}_6\text{H}_{10}\text{)-CO-}^*$

o



El enlazador L_P puede comprender épsilon-lisina (ϵ -Lys).

25

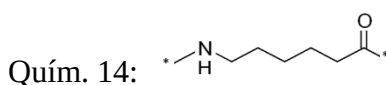
El enlazador L_P puede comprender lisina (Lys).

El enlazador L_P puede comprender Ahx. Ahx también se denomina ácido aminocaproico, ácido 6-aminohexanoico y se define por

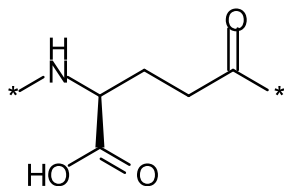
Quím. 13: $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-}^*$

o

30



El enlazador L_p puede comprender un dirradical Glu, tal como
Quím. 15:



en donde el dirradical Glu puede incluirse p veces, donde p es un número entero en el intervalo de 1-3.

El Quím. 15 también puede denominarse como gamma-Glu, o brevemente γ Glu, debido al hecho de que este es el grupo gamma carboxilo del aminoácido ácido glutámico que se usa aquí para la conexión al grupo épsilon amino de la lisina. Como se explicó anteriormente, el otro elemento enlazador puede ser, por ejemplo, otro residuo Glu, o una molécula Ado. El grupo amino de Glu, a su vez, forma un enlace amida con el grupo carboxilo del resto de prolongación, o con el grupo carboxilo de, por ejemplo, una molécula de Ado, si está presente, o con el grupo gamma carboxilo de, por ejemplo, otro Glu, si está presente.

Alternativamente, los derivados polipeptídicos de ISVD descritos en la presente descripción pueden comprender un enlazador (L_p) que se selecciona de cualquiera de los representados en la Tabla 2 más abajo. R1 representa el residuo en el polipéptido de ISVD al que se une el resto de prolongación y P representa el prolongador.

Basado en la descripción en la presente descripción, el experto será capaz de determinar el(los) enlazador(es) L_P y L_{1-2} óptimo(s) para su uso en un derivado polipeptídico de ISVD específico como se describe en la presente descripción, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados. Por ejemplo, los enlazadores son preferentemente de manera que permitan que cada ISVD,

5 tal como un fragmento V_{HH} , en el polipéptido de ISVD se una a su objetivo. De nuevo, basado a la descripción en la presente descripción, el experto en la técnica será capaz de determinar el(los) enlazador(es) óptimo(s) para su uso en un derivado polipeptídico de ISVD específico como se describe en la presente descripción, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

10 Un residuo de aminoácido en la cadena principal del polipéptido de ISVD o ISVD al que tiene lugar la unión se designa R1 en la presente descripción. En caso de que se una más de un resto de prolongación, el(los) sitio(s) de unión adicional(es) puede(n) designarse R2, R3, etcétera. El resto de prolongación puede unirse a un residuo de cisteína o lisina en la primera porción del ISVD de la cadena principal del polipéptido de ISVD.

15 El resto de prolongación puede unirse a un residuo de cisteína o lisina en la segunda porción del ISVD de la cadena principal del polipéptido de ISVD. El resto de prolongación puede unirse a un residuo de cisteína o lisina en la porción del enlazador opcional (L_{1-2}) de la cadena principal del polipéptido de ISVD.

20 El resto de prolongación puede unirse covalentemente a un residuo de lisina en la cadena principal del polipéptido de ISVD. El resto de prolongación puede unirse mediante un enlace amida formado entre un grupo de ácido carboxílico en el resto de prolongación y el grupo épsilon amino del residuo de lisina.

25 El resto de prolongación puede unirse covalentemente a un residuo de cisteína en la cadena principal del polipéptido de ISVD. El resto de prolongación puede unirse mediante un enlace tioéter formado entre el resto de prolongación y el átomo de azufre del residuo de cisteína en el polipéptido.

Por tanto, en algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente descripción puede comprender uno, dos o tres residuos de lisina o cisteína y uno, dos o tres restos de prolongación, en donde cada resto de prolongación se une a una cadena lateral de un único residuo de lisina o cisteína. Cuando la unión tiene lugar a través de un residuo de cisteína, la cisteína es preferentemente una

30 cisteína libre.

Una cisteína libre, en algunas modalidades introducida mediante la tecnología de ADN recombinante, puede servir como un sitio de conjugación para unir uno o más restos de ácidos grasos de diácido C16, C17 o C18 gamma-Glu 2xOEG.

En una modalidad preferida, una cisteína libre, introducida opcionalmente mediante tecnología de ADN recombinante, puede servir como un sitio de conjugación para unir uno, dos o tres restos de ácidos grasos diácidos C18 gamma-Glu 2xOEG

(Nombre IUPAC S{Beta-AA#}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi] acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil], unión de aminoácido AA#).

En otra modalidad preferida, una cisteína libre, introducida opcionalmente mediante tecnología de ADN recombinante, puede servir como un sitio de conjugación para unir uno, dos o tres restos de ácidos grasos diácido C17 gamma-Glu 2xOEG

(nombre IUPAC S{Beta-AA#}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-carboxihexadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil], unión de aminoácido AA#).

En una modalidad de máxima preferencia, una cisteína libre, introducida mediante tecnología de ADN recombinante, puede servir como un sitio de conjugación para unir una, dos o tres restos de ácidos grasos de diácidos C16 gamma-Glu 2xOEG

(nombre IUPAC S{Beta-AA#}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil], unión de aminoácidos AA#).

El término “cromatografía estándar” como se usa en la presente descripción abarca métodos cromatográficos estándar, tales como cromatografía de proteína A, intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrófoba y hidroxiapatita.

El término “residuo de aminoácido expuesto en la superficie” como se usa en la presente descripción se refiere a residuos de aminoácidos cuya cadena lateral puede estar en contacto con moléculas de solvente (que en general pueden ser principalmente moléculas de agua). Sin embargo, la cadena lateral no tiene necesariamente que estar totalmente en contacto con las moléculas de solvente, y cuando incluso una porción de la cadena lateral está en contacto con las moléculas de solvente, el residuo de aminoácido se define como un "aminoácido ubicado en la superficie". Los residuos de aminoácidos ubicados en la superficie de un polipéptido también pueden incluir residuos de aminoácidos ubicados cerca de la superficie de ISVD y de esta manera pueden tener una influencia

de carga eléctrica mutua de otros residuos de aminoácidos cuya cadena lateral, incluso parcialmente, está en contacto con las moléculas de solvente. Los expertos en la técnica pueden preparar un modelo de homología o un modelo molecular tridimensional basado en aprendizaje automático de un polipéptido o anticuerpo mediante, por ejemplo, el modelado de homología o aprendizaje automático mediante el uso de programas informáticos disponibles comercialmente o públicamente. Alternativamente, es posible usar métodos tales como cristalografía de rayos X para la generación de modelos moleculares tridimensionales. Los residuos de aminoácidos que pueden exponerse en la superficie pueden determinarse, por ejemplo, mediante el uso de coordenadas a partir de un modelo molecular tridimensional de un anticuerpo mediante el uso de un programa de computadora tal como MOE (Chemical Computing Group) o Bioluminate (Schrödinger). Los sitios expuestos en la superficie pueden determinarse mediante el uso de algoritmos conocidos en el campo técnico (por ejemplo, Lee y Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400; Connolly, J. Appl. Cryst. (1983) 16:548-558). Los sitios que pueden exponerse en la superficie pueden determinarse mediante el uso de un programa informático adecuado para el modelado de proteínas y el análisis de la información de la estructura tridimensional obtenida del anticuerpo. El programa informático disponible para tales fines incluye, por ejemplo, el MOE (Chemical Computing Group) o Bioluminate (Schrödinger). El área de la superficie accesible al solvente (en Å²) se calcula mediante el uso de una sonda de agua con un radio de sonda de 1.4 Å. Además, Pacios ha descrito métodos para determinar las regiones y áreas expuestas en la superficie mediante el uso de un programa informático para computadoras personales (Pacios, Comput. Chem. 18(4):377-386 (1994); J. Mol. Model. 1:46-53 (1995)). En base a dicha información como se describió anteriormente, pueden seleccionarse residuos de aminoácidos apropiados ubicados en la superficie de un anticuerpo en contacto con el solvente.

Composiciones Farmacéuticas

Los derivados polipeptídicos V_HH como se describe en la presente descripción pueden prepararse en composiciones farmacéuticas. En algunas modalidades, dicha composición comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente" como se usa en la presente, se refiere en sentido amplio a cualquier componente distinto del ingrediente terapéutico activo (API). Los excipientes pueden servir para diversos propósitos, por ejemplo, como portador, vehículo, relleno, aglutinante, lubricante, deslizante, desintegrante, agente de control de flujo, inhibidores de la cristalización, solubilizante, estabilizante, agente colorante, agente saborizante, surfactante, emulsionante, agente de suministro,

hidrótopo o sus combinaciones y/o para mejorar la administración, y/o la absorción del(de los) ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s).

La cantidad de cada excipiente usado puede variar dentro de los intervalos convencionales en la técnica. Las técnicas y excipientes que pueden usarse para formular formas de dosificación orales se describen en Handbook of Pharmaceutical Excipients, 8va edición, Sheskey y otros, Eds., American Pharmaceuticals Association and the Pharmaceutical Press, publicaciones del departamento de la Royal Pharmaceutical Society de Gran Bretaña (2017); y Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 22da edición, Remington y Allen, Eds., Pharmaceutical Press (2013).

En modalidades preferidas, la composición que comprende un polipéptido V_{HH} comprende además un agente de suministro y un hidrótopo.

Un agente de suministro preferido es una sal de ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprílico (NAC).

En algunas modalidades, el agente de suministro es una sal de ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprílico como se describió en el documento WO2007/121318. En algunas modalidades, el agente de suministro es el N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato de sodio (denominado "SNAC" en la presente descripción), conocido también como 8-(saliciloilamino)octanoato de sodio.

Las composiciones farmacéuticas comprenden preferentemente uno o más hidrótopos. Los hidrótopos, como un surfactante, incluyen tanto una parte hidrófila como una hidrófoba y pueden formar micelas y autoagregarse, sin embargo, solubilizan solutos sin solubilización micelar. En una modalidad, el hidrótopo es capaz de aumentar la solubilidad de SNAC. En una modalidad, el hidrótopo es nicotinamida (NAM).

En una modalidad, la composición es una composición sólida. La composición puede estar en una forma adecuada para la administración peroral, tal como un comprimido, sobre o cápsula. En una modalidad de este tipo, la composición se formula como un comprimido. Las composiciones sólidas proporcionadas en la presente descripción permiten una disolución acelerada y, de esta manera, posibilitan una rápida absorción del ingrediente farmacéutico activo.

Administración y dosis

Un compuesto como se describe en la presente descripción, tal como un derivado polipeptídico V_{HH} , puede administrarse por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, tal como por vía intramuscular, tal como por vía subcutánea en una composición farmacéutica adecuada. El compuesto puede administrarse a través de una vía no parenteral y preferentemente por vía peroral (PO). El compuesto

puede administrarse profilácticamente. El compuesto puede administrarse terapéuticamente (a demanda).

Administración subcutánea

La dosis de los compuestos que se suministrarán por administración subcutánea puede ser de aproximadamente 0.01 mg a 1 mg del compuesto por día, preferentemente, de aproximadamente 0.05 mg a 5 mg por día, y con mayor preferencia, de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 10 mg por día, por cada segundo día, por cada tercer día, por cuarto día, por quinto día, por cada sexto día o una vez a la semana en dependencia de la gravedad de la afección. Una dosis adecuada también puede ajustarse para un compuesto particular basado en las propiedades de ese compuesto, lo que incluye su vida media *in vivo* o tiempo medio de residencia y su actividad biológica.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un dispositivo de inyección con el contenido de dicha composición.

Administración peroral (PO)

La dosis de los compuestos que se suministrarán por vía oral puede ser de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto por día, por cada segundo día, por cada tercer día, en dependencia de la gravedad de la afección. Una dosis adecuada también puede ajustarse para un compuesto particular basado en las propiedades de ese compuesto, lo que incluye su vida media *in vivo* o tiempo medio de residencia y su actividad biológica.

Las composiciones que contienen los compuestos como se describe en la presente pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o en algunas modalidades, terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un sujeto que ya padece de una enfermedad, tal como cualquier trastorno hemorrágico como se describió anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente efectiva". Como comprenderán los expertos en la técnica, las cantidades efectivas para este propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o de la lesión, así como también del peso y el estado general del sujeto.

MODALIDADES

1. Un derivado polipeptídico de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este,

al menos un resto de prolongación,
 opcionalmente un enlazador (L_{1-2}) que enlaza ISVD1 e ISVD2, y
 opcionalmente una o más extensiones (E).

2. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 1 que tiene la fórmula

- 5 ISVD1 – ISVD2, o
 ISVD1 – ISVD2 – E, o
 ISVD2 – ISVD1 – E, o
 E - ISVD1 - ISVD2, o
 ISVD1 – L_{1-2} – ISVD2 – E, o
 10 ISVD2 – L_{1-2} – ISVD1 – E, o
 E - ISVD1 – L_{1-2} – ISVD2,

3. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 1 que tiene la fórmula (N- a C-terminal)

- ISVD1 – ISVD2, o
 15 ISVD2 – ISVD1, o
 ISVD1 – ISVD2 – E, o
 ISVD2 – ISVD1 – E, o
 E - ISVD1 - ISVD2, o
 E – ISVD2 – ISVD1, o
 20 ISVD1 – L_{1-2} – ISVD2, o
 ISVD2 – L_{1-2} – ISVD1, o
 ISVD1 – L_{1-2} – ISVD2 – E, o
 ISVD2 – L_{1-2} – ISVD1 – E, o
 E - ISVD1 – L_{1-2} – ISVD2, o
 25 E – ISVD2 – L_{1-2} – ISVD1.

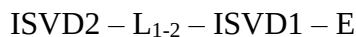
4. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el al menos un resto de prolongación se une a uno o más residuos expuestos en la superficie.

5. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene la fórmula (N- a C-terminal)

- 30 ISVD2 – L_{1-2} – ISVD1 – E

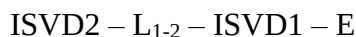
en donde uno o más restos de prolongación se unen a uno o más residuos expuestos en la superficie.

6. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene la fórmula (N- a C-terminal)



en donde dos restos de prolongación se unen a uno o más residuos expuestos en la superficie en E.

5 7. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene la fórmula (N- a C-terminal)



que comprende además

10 un primer resto de prolongación y un segundo resto de prolongación que se unen a un primer residuo expuesto en la superficie y un segundo residuo expuesto en la superficie en E, respectivamente.

8. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde L_{1-2} comprende una relación de aminoácidos hidrófobos a hidrófilos de “40 a 60 %” a “60 a 40 %”.

15 9. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva).

20 10. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende al menos 4, 5, 6, 7 u 8 de los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva).

25 11. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva).

12. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 y D179 (numeración consecutiva).

30 13. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177 y L178 (numeración consecutiva).

14. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 y D179 (numeración consecutiva).
- 5 15. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende al menos 3, 4, 5 o 6 de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 y D179 (numeración consecutiva).
16. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores,
10 en donde el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 y D179 (numeración consecutiva).
17. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
- 15 el primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva), y
- el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177 y L178 (numeración
20 consecutiva).
18. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
- el primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este que comprende los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253,
25 P255, H257 y N260 (numeración consecutiva), y
- el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) que comprende los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177, L178 y D179 (numeración consecutiva).
19. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-9, en donde el primer ISVD comprende un parátipo que comprende los residuos de aminoácidos F29, N30, Y32,
30 T54, D99, R100, S101, F102, L103, F104, Q106, A107 y N113 (SEQ ID NO:35), y
- en donde el segundo ISVD comprende un parátipo que comprende los residuos de aminoácidos

a) D32, A33, M34, G35, Y37, L47, V48, A49, G50, I51, M52, N57, T58, N59, Y60, T61, K97, V99, R101 y P102 (SEQ ID NO:27), o

b) A33, M34, G35, W47, V48, A49, A50, I51, S52, S57, T58, N59, Y60, A61, A97, A98, D99, G105, L107 y Y109 (SEQ ID NO:734)

5 (numeración consecutiva).

20. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-9, en donde dicho primer ISVD comprende

1)

CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:172), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

10 CDR2: GLRWTDSTSEYADSVKG (SEQ ID NO:173), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,

CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:174), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (definición de Kabat).

21. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con las modalidades 1-9, en donde dicho
15 segundo ISVD comprende

(A)

CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:168), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:169), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,

20 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:170), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o

(B)

CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:128), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,

25 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:129), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:130), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos
(definición de Kabat).

30 22. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-9, en donde dicho primer ISVD comprende

1)

CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:172), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,

CDR2: GLRWTDSTEYADSVKG (SEQ ID NO:173), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,

5 CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:174), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o

y en donde dicho segundo ISVD comprende

(A)

CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:168), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

10 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:169), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

CDR3: DDSVGDDGYLDY (SEQ ID NO:170), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o

(B)

15 CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:128), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:129), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

CDR3: DDSVGDDGYLDY (SEQ ID NO:130), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos

20 (numeración de Kabat).

23. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 20-22, en donde dicha(s) sustitución(ones) es(son) sustitución(ones) conservadora(s).

24. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la secuencia de dicho primer ISVD es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %
25 idéntica a la secuencia identificada por la SEQ ID NO:107, 115, 123, 131, 155 o 171, respectivamente.

25. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la secuencia de dicho segundo ISVD es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %
30 idéntica a la secuencia identificada por la SEQ ID NO:103, 111, 119, 127, 151 o 167, respectivamente.

26. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la secuencia de dicho primer ISVD es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %

idéntica a la secuencia identificada por la SEQ ID NO:107, 115, 123, 131, 155 o 171, respectivamente, y en donde la secuencia de dicho segundo ISVD es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia identificada por la SEQ ID NO:103, 111, 119, 127, 151 o 167, respectivamente.

- 5 27. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de
V_{HH}-2.20 (SEQ ID NO:171),
V_{HH}-2.18 (SEQ ID NO:155),
V_{HH}-2.15 (SEQ ID NO:131),
10 V_{HH}-2.13 (SEQ ID NO:115),
V_{HH}-2.14 (SEQ ID NO:123) o
V_{HH}-2.12 (SEQ ID NO:107).
28. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho segundo ISVD comprende la secuencia de
15 V_{HH}-1.20 (SEQ ID NO:167),
V_{HH}-1.18 (SEQ ID NO:151),
V_{HH}-1.15 (SEQ ID NO:127),
V_{HH}-1.13 (SEQ ID NO:111),
V_{HH}-1.14 (SEQ ID NO:119) o
20 V_{HH}-1.12 (SEQ ID NO:103).
29. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de
V_{HH}-2.20 (SEQ ID NO:171),
V_{HH}-2.18 (SEQ ID NO:155),
25 V_{HH}-2.15 (SEQ ID NO:131),
V_{HH}-2.13 (SEQ ID NO:115),
V_{HH}-2.14 (SEQ ID NO:123) o
V_{HH}-2.12 (SEQ ID NO:107)
y en donde
30 dicho segundo ISVD comprende la secuencia de
V_{HH}-1.20 (SEQ ID NO:167),
V_{HH}-1.18 (SEQ ID NO:151),

V_HH-1.15 (SEQ ID NO:127),
V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111),
V_HH-1.14 (SEQ ID NO:119) o
V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).

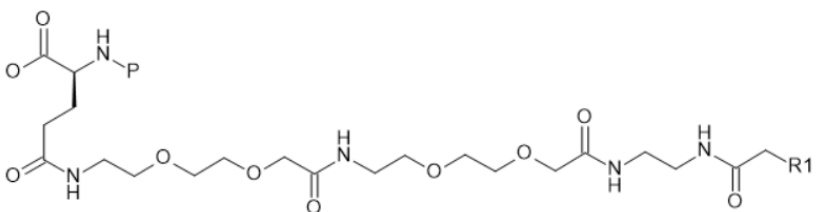
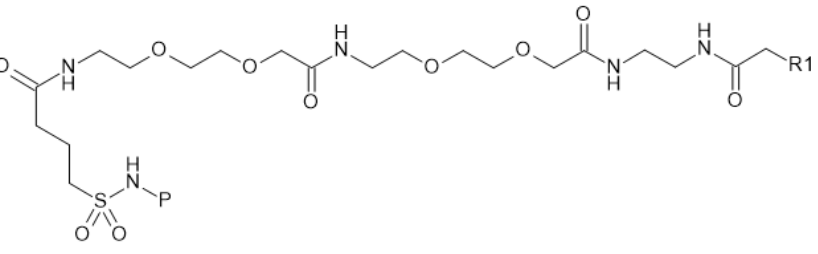
- 5 30. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 29, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171), y en donde dicho segundo ISVD comprende la secuencia de V_HH-1.20 (SEQ ID NO:167).
31. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 29, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de V_HH-2.18 (SEQ ID NO:155), y en donde
10 dicho segundo ISVD comprende la secuencia de V_HH-1.18 (SEQ ID NO:151).
32. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con las modalidades 2929, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de V_HH-2.15 (SEQ ID NO:131), y en donde dicho segundo ISVD comprende la secuencia de V_HH-1.15 (SEQ ID NO:127).
33. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 29, en donde
15 dicho primer ISVD comprende la secuencia de V_HH-2.13 (SEQ ID NO:115), y en donde dicho segundo ISVD comprende la secuencia de V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111).
34. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 29, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de V_HH-2.14 (SEQ ID NO:123), y en donde dicho segundo ISVD comprende la secuencia de V_HH-1.14 (SEQ ID NO:119).
- 20 35. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 29, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de V_HH-2.12 (SEQ ID NO:107), y en donde dicho segundo ISVD comprende la secuencia de V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).
36. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el(los) resto(s) de prolongación comprende(n) un prolongador seleccionado de los grupos
25 que consisten en
- a) un diácido C16, diácido C17, diácido C18, diácido C19, diácido C20, diácido C21 o diácido C22,
 - b) tetrazol,
 - c) un péptido de unión a albúmina, tal como RLIEDICLPRWGCLWEDD (SEQ ID NO:737)
 - 30 d) un péptido de unión a FcRn, tal como QRFGCTGHFGGLYPCNG (SEQ ID NO:738), y
 - e) un péptido aglutinante Fc, tal como FNMQQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDN (SEQ ID NO:739).

37. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el o los restos de prolongación comprenden un prolongador seleccionado del grupo que consiste en diácido C16, diácido C17, diácido C18, diácido C19 y diácido C20.

38. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 34, en donde el(los) prolongador(es) es(son) un prolongador diácido C16.

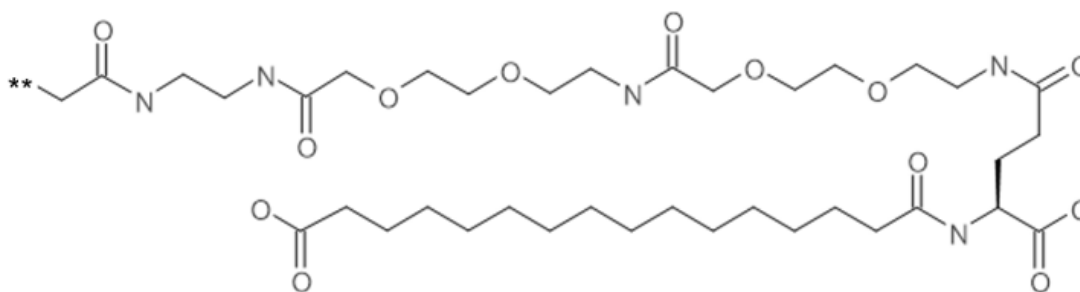
39. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el resto de prolongación comprende un enlazador L_P que une el prolongador a ISVD1, L_{1-2} , ISVD2 o E.

40. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 39, en donde L_P se selecciona del grupo que consiste en

L _{P1}	
L _{P2}	
L _{P3}	“R1” - GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:25) – “P” o “P” - GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:25) – “R1”
L _{P4}	“R1” - GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:26) - “P” o “P” - GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:26) – “R1”

41. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el(los) resto(s) de prolongación está(n) unido(s) a la posición 13 en ISVD2 y/o una o más de las posiciones 12, 14, 15, 42, 44, 63 y/u 85 en ISVD1 (numeración consecutiva).

42. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde el derivado polipeptídico de ISVD comprende una extensión C-terminal, en donde el(los) resto(s) de prolongación se une(n) a dicha extensión C-terminal.



en donde ‘*’ (R1) representa el punto de acoplamiento en el polipéptido de ISVD para el primer resto de prolongación, y

en donde ‘**’ (R2) representa el punto de acoplamiento en el polipéptido de ISVD para el segundo resto de prolongación,

en donde ‘*’ es Cys en la posición 257 de SEQ ID NO:629, y

en donde ‘**’ es Cys en la posición 259 de SEQ ID NO:629.

51. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el punto isoelectrónico de dicho polipéptido, determinado mediante el uso de isoelectroenfoque, es 6.5 o menos.

52. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado polipeptídico es un derivado polipeptídico multiespecífico tal como un derivado polipeptídico biespecífico o triespecífico.

53. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado polipeptídico es un derivado polipeptídico biespecífico.

54. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado polipeptídico tiene un peso molecular en el intervalo de 12-50 kDa, tal como 12-48 kDa, tal como 12-43 kDa, tal como 12-37 kDa, tal como 12-35 kDa, tal como 12-32 kDa, tal como 12-27 kDa, tal como 12-22 kDa, tal como 12-18 kDa, tal como 14-50 kDa, tal como 14-48 kDa, tal como 14-43 kDa, tal como 14-37 kDa, tal como 14-35 kDa, 14-32 kDa, tal como 14-27 kDa, tal como 14-22 kDa, tal como 14-18 kDa, tal como 22-50 kDa, 22-48 kDa, tal como 22-43 kDa, tal como 22-37 kDa, tal como 22-35 kDa, tal como 22-32 kDa, tal como 22-31 kDa, tal como 22-30 kDa, tal como 22-29 kDa, tal como 22-28 kDa, tal como 22-27 kDa, tal como 24-50 kDa, 24-48 kDa, tal como 24-43 kDa, tal como 24-37 kDa, tal como 24-35, tal como 24-32 kDa, tal como 24-31 kDa, 24-30 kDa, 24-29 kDa, 24-28 kDa, tal como 24-27 kDa, tal como 36-48 kDa, tal como 36-43 kDa, tal como 36-37 kDa, tal como 28-36 kDa, tal como 29-33 kDa, tal como 29-30 tal como

aproximadamente 29, tal como 29, tal como aproximadamente 30, tal como 30, tal como 30-32 kDa, o tal como 31 kDa.

55. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que no es un derivado polipeptídico de ISVD dirigido a la membrana.

5 56. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho resto de prolongación no es capaz de unirse a componentes de una membrana plasmática, tal como un aminofosfolípido, tal como una fosfatidilserina y/o fosfatidiletanolamina.

57. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho resto de prolongación no es capaz de unirse a proteínas de superficie plaquetaria
10 tales como GPIb-IX, chaperona de colágeno HSP47, efrina B1, proteína tiol isomerasa ERP5, proteína de interacción con la progenitora hematopoyética cinasa 1 de 55 (HIP-55), glicoproteína VI, glicoproteína plaquetaria 1b, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor I de agregación endotelial plaquetaria, CD31, CD36, MARKS, multimerina, integrina alfa IIb/beta 3, transcrito 1 similar al receptor activador expresado en células mieloides (TREM) (TLT-1), cinasa
15 ligada a integrina (ILK), cixina, colágeno, P-selectina, Factor XIII, ligando 1 de glicoproteína P-selectina, integrina alfa 6 beta 1, trombospondina, factor de von Willebrand, G6B, CD42b, proteína de unión a syntaxina 2, fosfatidiletanolamina, fibrinógeno/fibrina, filamina, estomatina, esfingolípido, CD31, CD36, CD40, CD41, CD42c, CD42, CD49b, CD61, CD62P, CD63, CD69, CD107a, CD107b, CD109, CD154, PECAM-1, y/o ERPS.

20 58. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho resto de prolongación no es capaz de unirse a un polipéptido asociado a la membrana, tal como glicoproteínas, GPIIb/IIIa, β 2GP1, TLT-1, selectinas, un factor de coagulación o complejo de factor de coagulación y/o una selectina.

59. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores,
25 en donde la vida media terminal tiempo medio de residencia en sangre se prolonga en al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 3, 4, 5 o 7 días en comparación con el polipéptido de ISVD sin dicho resto de prolongación.

60. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho primer y/o segundo ISVD es/son un fragmento V_HH.

30 61. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-59, en donde dicho primer y/o segundo ISVD es un fragmento V-NAR.

62. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-60, en donde dicho derivado polipeptídico de ISVD es un derivado polipeptídico V_HH.

63. Un derivado polipeptídico V_HH procoagulante que comprende un primer V_HH capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este,

5 un segundo V_HH capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2),

un enlazador (L₁₋₂) que enlaza dicho primer V_HH y dicho segundo V_HH, y

una extensión C-terminal (E), y

uno o dos restos de prolongación,

que tiene la fórmula (N- a C-terminal):

10 “segundo V_HH” – L₁₋₂ – “primer V_HH” – E

en donde

I)

dicho primer V_HH comprende

CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:172),

15 CDR2: GLRWTDSTSEYADSVKG (SEQ ID NO:173),

CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:174), y

dicho segundo V_HH comprende

CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:168),

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:169),

20 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:170); o

II)

dicho primer V_HH comprende

CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:132),

CDR2: GLRWTDSTSEYADSVKG (SEQ ID NO:133),

25 CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:134), y

dicho segundo V_HH comprende

CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:128),

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:129),

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:130); o

30 (definición de Kabat).

64. El derivado polipeptídico V_HH procoagulante de acuerdo con la modalidad 63, en donde

I)

dicho primer V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-2.20 (SEQ ID NO:171), y
dicho segundo V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-1.20 (SEQ ID NO:167).

II)

dicho primer V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-2.18 (SEQ ID NO:155), y

5 dicho segundo V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-1.18 (SEQ ID NO:151).

III)

dicho primer V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-2.15 (SEQ ID NO:131), y

dicho segundo V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-1.15 (SEQ ID NO:127).

IV)

10 dicho primer V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-2.13 (SEQ ID NO:115), y

dicho segundo V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-1.13 (SEQ ID NO:111).

V)

dicho primer V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-2.14 (SEQ ID NO:123), y

dicho segundo V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-1.14 (SEQ ID NO:119).

15 VI)

dicho primer V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-2.12 (SEQ ID NO:107), y

dicho segundo V_{HH} comprende la secuencia de V_{HH}-1.12 (SEQ ID NO:103).

65. El derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades
1-60 y 62-64, en donde dicho derivado polipeptídico V_{HH} es un derivado polipeptídico V_{HH}
20 biespecífico.

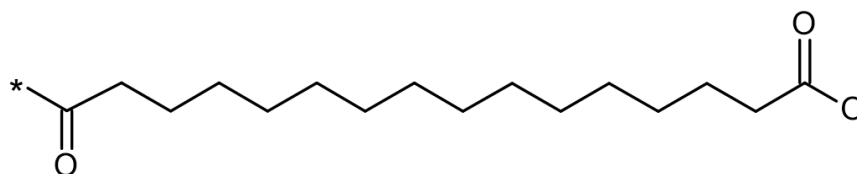
66. El derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades
63-65, en donde el enlazador L₁₋₂ comprende los residuos de aminoácidos GQAPGQ (SEQ ID
NO:20).

67. El derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades
25 63-65, en donde la extensión (E) comprende los residuos de aminoácidos GQACPC (SEQ ID NO:9).

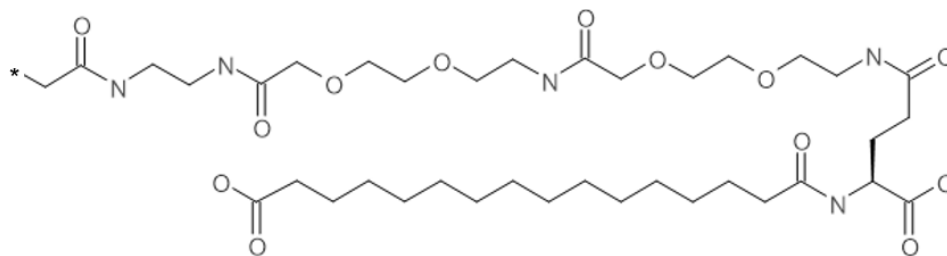
68. El derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades
63-67, en donde dos restos de prolongación se unen a E en las posiciones 4 y 6 (SEQ ID NO:9),
respectivamente.

69. El derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades
30 63-68, en donde dichos dos restos de prolongación son idénticos.

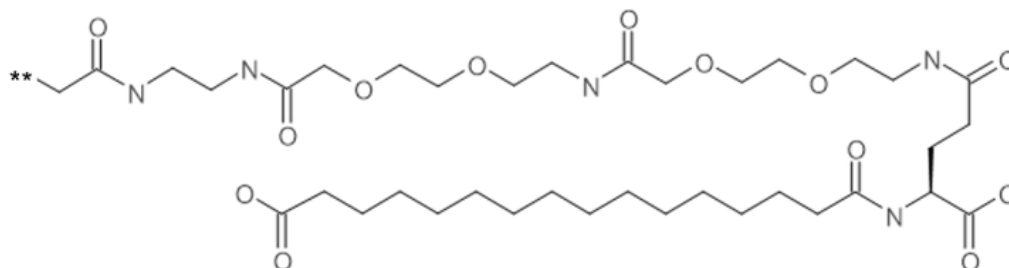
70. El derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades
63-69, en donde dichos dos restos de prolongación comprenden la estructura:



71. El derivado polipeptídico V_{HH} procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 63-70, que comprende un primer y un segundo resto de prolongación en donde dicho primer resto de prolongación comprende la estructura:



y en donde dicho segundo resto de prolongación comprende la estructura



en donde ‘*’ (R1) representa el punto de acoplamiento en el derivado polipeptídico V_{HH} para el primer resto de prolongación, y

en donde ‘**’ (R2) representa el punto de acoplamiento en el derivado polipeptídico V_{HH} para el segundo resto de prolongación,

en donde ‘*’ es Cys en la posición 257 de SEQ ID NO:629, y

en donde ‘**’ es Cys en la posición 259 de SEQ ID NO:629.

72. Una composición farmacéutica que comprende el derivado polipeptídico de ISVD o derivado polipeptídico V_{HH} de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-71.

73. Una composición farmacéutica para la administración peroral que comprende el derivado polipeptídico de ISVD o derivado polipeptídico V_{HH} de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-7071.

74. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 72 o 73, en donde el derivado polipeptídico de ISVD es un derivado polipeptídico V_{HH}.

75. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 72 o 73, en donde el derivado polipeptídico de ISVD es un derivado polipeptídico V-NAR.
76. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 72-75, en donde dicha composición comprende una sal de ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprílico.
- 5 77. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 76, en donde dicha sal de ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprílico es N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato de sodio (SNAC).
78. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 76 a 77 que comprende además nicotinamida (NAM).
79. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 74-78, en donde
10 dicha composición comprende un derivado polipeptídico V_HH, N-(8-[2-hidroxibenzoil] amino) caprilato de sodio (SNAC), nicotinamida (NAM) y estearato de magnesio.
80. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 74-78, en donde dicha composición comprende aproximadamente 7 % p/p del derivado polipeptídico V_HH, aproximadamente 55 % p/p de N-(8-[2-hidroxibenzoil]amino)caprilato de sodio (SNAC),
15 aproximadamente 36 % p/p de nicotinamida (NAM) y aproximadamente 0.5 % p/p de estearato de magnesio.
81. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 73-80, en donde dicha composición es una composición líquida.
82. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 73-80, en donde
20 dicha composición es una composición sólida.
83. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 82, en donde dicha composición es un comprimido, pastilla o cápsula.
84. Un método para tratar a un paciente que lo necesita, que comprende administrar el derivado polipeptídico de ISVD, el derivado polipeptídico V_HH o composición farmacéutica de acuerdo con
25 cualquiera de las modalidades 1-83.
85. El método de tratamiento de acuerdo con la modalidad 84, en donde el paciente es un paciente que padece de hemofilia A con o sin inhibidores o hemofilia A adquirida.
86. El método de tratamiento de acuerdo con la modalidad 84 o 85, en donde el tratamiento es un tratamiento profiláctico.
- 30 87. El método de tratamiento de acuerdo con cualquiera de las modalidades 84-86, en donde el derivado polipeptídico de ISVD, el derivado polipeptídico V_HH o la composición farmacéutica se administra por vía peroral.

88. El método de tratamiento de acuerdo con cualquiera de las modalidades 84-86, en donde el derivado polipeptídico de ISVD, el derivado polipeptídico V_{HH} o la composición farmacéutica se administra por inyección subcutánea.
89. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_{HH} o composición farmacéutica
5 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-83 para su uso en medicina.
90. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_{HH} o composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-83 para su uso en el tratamiento de la hemofilia, tal como hemofilia A con o sin inhibidores, o tal como hemofilia A adquirida.
91. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_{HH} o composición de acuerdo
10 con cualquiera de las modalidades 1-83 para su uso en el tratamiento de la hemofilia A con o sin inhibidores.
92. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_{HH} o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las modalidades 89-92, en donde el tratamiento es tratamiento profiláctico.
93. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_{HH} o composición para su uso de
15 acuerdo con cualquiera de las modalidades 89-92, en donde dicho derivado o composición se administra por vía peroral.
94. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_{HH} o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las modalidades 89-92, en donde dicho derivado o composición se administra mediante inyección subcutánea.
- 20 95. Un método para producir un derivado polipeptídico de dominio variable único de inmunoglobulina procoagulante (ISVD) que comprende
un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este,
un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este,
uno o más restos de prolongación,
25 opcionalmente un enlazador capaz de enlazar ISVD1 e ISVD2 (“L₁₋₂”), y
opcionalmente una o más extensiones (“E”)
que comprende las etapas de
a. modificar un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos de un polipéptido de
ISVD o derivado polipeptídico de ISVD de manera que se reduzca el punto isoeléctrico del
30 polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD
b. cultivar células huésped para expresar el ácido nucleico que codifica el polipéptido de ISVD o
derivado polipeptídico de ISVD,

- c. recolectar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped,
 - d. purificar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped mediante el uso de cromatografía estándar, y
 - 5 e. unir un resto de prolongación al polipéptido de ISVD, a menos que dicho resto ya esté presente.
96. Un método para producir un polipéptido de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) o derivado polipeptídico de ISVD procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, un resto de prolongación,
- 10 opcionalmente un enlazador capaz de enlazar ISVD1 e ISVD2 (“L₁₋₂”), y opcionalmente una o más extensiones (“E”) que comprende las etapas de
- a. modificar un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD de manera que el punto isoelectrico del polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD sea 6.5 o menos,
 - 15 b. cultivar células huésped para expresar el ácido nucleico que codifica el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD,
 - c. recolectar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped,
 - d. purificar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células
 - 20 huésped mediante el uso de cromatografía estándar, y
 - e. unir un resto de prolongación al polipéptido de ISVD, a menos que dicho resto ya esté presente.
97. Un método para aumentar la biodisponibilidad oral de un polipéptido de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) o derivado polipeptídico de ISVD procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este,
- 25 un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, un resto de prolongación, opcionalmente un enlazador capaz de enlazar ISVD1 e ISVD2 (“L₁₋₂”), y opcionalmente una o más extensiones (“E”) que comprende las etapas de
- a. modificar un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD de manera que se reduzca el punto isoelectrico del polipéptido de
 - 30 ISVD o derivado polipeptídico de ISVD,
 - b. cultivar células huésped para expresar el ácido nucleico que codifica el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD,

- c. recolectar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped,
- d. purificar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped mediante el uso de cromatografía estándar, y
- 5 e. unir un resto de prolongación al polipéptido de ISVD, a menos que dicho resto ya esté presente.
98. Un método para aumentar la biodisponibilidad oral de un polipéptido de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) o derivado polipeptídico de ISVD procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este,
- 10 un resto de prolongación, opcionalmente un enlazador capaz de enlazar ISVD1 e ISVD2 (“L₁₋₂”), y opcionalmente una o más extensiones (“E”) que comprende las etapas de
- a. modificar un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD de manera que el punto isoeléctrico del polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD sea 6.5 o menos,
- 15 b. cultivar células huésped para expresar el ácido nucleico que codifica el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD,
- c. recolectar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped,
- d. purificar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células
- 20 huésped mediante el uso de cromatografía estándar, y
- e. unir un resto de prolongación al polipéptido de ISVD, a menos que dicho resto ya esté presente.
99. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-98, en donde el punto isoeléctrico se reduce en al menos 0.5 unidades de pH, tal como al menos 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8,
- 25 3.9 o 4 unidades de pH.
100. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-99, en donde la etapa e) no conduce a un aumento del punto isoeléctrico del polipéptido de ISVD o derivado de polipéptido de ISVD.
101. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-100, en donde el punto isoeléctrico se determina mediante el uso de enfoque isoeléctrico.
- 30 102. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-101, en donde el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD se codifica por un solo ácido nucleico.

103. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-101, en donde el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD es un conjugado de un primer y segundo ISVD, en donde dicho primer y segundo ISVD se codifican por ácidos nucleicos separados.
104. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-103, en donde el polipéptido de
5 ISVD o derivado polipeptídico de ISVD es un polipéptido V_HH o derivado polipeptídico V_HH.
105. Un polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD producido mediante el uso del método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-103.
106. Un polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD obtenible mediante el uso del método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-103.
- 10
107. Un polipéptido V_HH o derivado polipeptídico V_HH producido mediante el uso del método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 95-104.
108. Un fragmento V_HH capaz de unirse al FIX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este (FIXa) en donde
- a. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:172, que comprende opcionalmente
15 una o dos sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:173, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:174, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o
- 20 b. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:156, que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:157, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:158, que comprende opcionalmente una,
25 dos o tres sustituciones de aminoácidos; o
- c. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:132, que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:133, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,
30 la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:134, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o

- d. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:116, que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:117, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,
- 5 la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:118, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o
- e. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:124, que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:125, que comprende opcionalmente una,
- 10 dos o tres sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:126, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o
- f. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:108, que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,
- 15 la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:109, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:110, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos;
(definición de Kabat).
- 20 109. Un fragmento V_{HH} capaz de unirse a FX (SEQ ID NO:2)
en donde
- a. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:152, que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:153, que comprende opcionalmente una,
- 25 dos o tres sustituciones de aminoácidos,
la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:154, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos; o
- b. la secuencia CDR1 se identifica mediante la SEQ ID NO:128, que comprende opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos,
- 30 la secuencia CDR2 se identifica mediante la SEQ ID NO:129, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos,

la secuencia CDR3 se identifica mediante la SEQ ID NO:130, que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

110. El fragmento V_HH de acuerdo con la modalidad 108 o 109, en donde dicha(s) sustitución(ones) es(son) sustitución(es) conservadora(s).

5 111. El fragmento V_HH de acuerdo con cualquiera de las modalidades 108-110, en donde dicho fragmento V_HH es un intermedio para su uso en la fabricación de un polipéptido V_HH o derivado polipeptídico V_HH que es capaz de unirse a FIX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este (FIXa), y capaz de unirse a FX (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este (FXa).

10 112. El polipéptido V_HH de acuerdo con cualquiera de las modalidades 108-110, en donde dicho polipéptido V_HH es un intermedio para su uso en la fabricación de un derivado polipeptídico de ISVD.

113. El ISVD o V_HH de acuerdo con la modalidad 109 o 110, en donde la actividad se mejora en términos de hacer que FX sea más propenso a la proteólisis por FIXa en comparación con cualquiera de los compuestos de ISVD anti-FX como se describe en el documento núm. WO2019/096874.

15 114. Un derivado polipeptídico de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, al menos un resto de prolongación,

20 opcionalmente un enlazador (L₁₋₂) que enlaza ISVD1 e ISVD2, y opcionalmente una o más extensiones (E), en donde dicho polipéptido de ISVD se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO:615-691, 734 o 735.

115. Un fragmento V_HH que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:27-614.

25 116. Un derivado polipeptídico V_HH que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:615-691 o 734-735.

117. Un derivado polipeptídico de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) procoagulante que comprende

30 un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, al menos un resto de prolongación, opcionalmente un enlazador (L₁₋₂) que enlaza ISVD1 e ISVD2, y

opcionalmente una o más extensiones (E).

118. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 117 que tiene la fórmula (N- a C-terminal)

ISVD2 – L₁₋₂ – ISVD1 – E

5 en donde uno o más restos de prolongación se unen a uno o más residuos expuestos en la superficie.

119. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 118 o 119 que tiene la fórmula (N- a C-terminal)

ISVD2 – L₁₋₂ – ISVD1 – E

en donde dos restos de prolongación se unen a uno o más residuos expuestos en la superficie en E,

10 y

en donde el peso molecular del derivado está en el intervalo de 20-35 kDa.

120. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 117-119, en donde

el primer ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada

15 de este que comprende los residuos de aminoácidos E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 (numeración consecutiva), y

el segundo ISVD es capaz de unirse a un epítipo en el Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este que comprende los residuos de aminoácidos N173, P174, F175, L177 y L178 (numeración consecutiva).

20 121. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 117-119, en donde dicho primer ISVD comprende

1)

CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:172), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

CDR2: GLRWTDSSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:173), que comprende opcionalmente una, dos o

25 tres sustituciones,

CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:174), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o

2)

CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:156), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

30 CDR2: GLRWTDSSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:157), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

- CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:158), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o
- 3)
- CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:132), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,
- 5 CDR2: GLRWTDSSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:133), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,
- CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:134), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o
- 4)
- 10 CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:116), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,
- CDR2: GLRWTDSSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:117), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,
- CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:118), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o
- 15 5)
- CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:124), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones
- CDR2: GLRWTDSSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:125), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,
- CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:126), que comprende opcionalmente una, dos o
- 20 tres sustituciones; o
- 6)
- CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:108), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,
- CDR2: GLRWTDSSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:109), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,
- 25 CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:110), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones;
- y en donde dicho segundo ISVD comprende
- (A)
- CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:168), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,
- 30 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:169), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:170), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o

(B)

CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:152), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

5 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:153), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:154), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o

(C)

10 CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:128), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:129), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:130), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o

15 (D)

CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:112), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:113), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

20 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:114), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o

(E)

CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:120), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:121), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

25 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:122), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones; o

(F)

CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:104), que comprende opcionalmente una o dos sustituciones,

30 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:105), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones,

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:106), que comprende opcionalmente una, dos o tres sustituciones (definición de Kabat).

122. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con la modalidad 121, en donde dicha(s) sustitución(ones) es(son) sustitución(es) conservadora(s).

123. El derivado polipeptídico de ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 117-122, en donde dicho primer ISVD comprende la secuencia de

V_HH-2.20 (SEQ ID NO:171),

V_HH-2.18 (SEQ ID NO:155),

10 V_HH-2.15 (SEQ ID NO:131),

V_HH-2.13 (SEQ ID NO:115),

V_HH-2.14 (SEQ ID NO:123), o

V_HH-2.12 (SEQ ID NO:107)

y en donde

15 dicho segundo ISVD comprende la secuencia de

V_HH-1.20 (SEQ ID NO:167),

V_HH-1.18 (SEQ ID NO:151),

V_HH-1.15 (SEQ ID NO:127),

V_HH-1.13 (SEQ ID NO:111),

20 V_HH-1.14 (SEQ ID NO:119) o

V_HH-1.12 (SEQ ID NO:103).

124. Un derivado polipeptídico V_HH procoagulante que comprende

un primer V_HH capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este,

un segundo V_HH capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este,

25 un enlazador (L₁₋₂) que enlaza dicho primer V_HH y dicho segundo V_HH, y

una extensión C-terminal (E), y

uno o dos restos de prolongación,

que tiene la fórmula (N- a C-terminal):

“segundo V_HH” – L₁₋₂ – “primer V_HH” – E

30 en donde

I)

dicho primer V_HH comprende

- CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:172),
 CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:173),
 CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:174), y
 dicho segundo V_HH comprende
- 5 CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:168),
 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:169),
 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:170); o
 II)
 dicho primer V_HH comprende
- 10 CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:156),
 CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:157),
 CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:158), y
 dicho segundo V_HH comprende
- 15 CDR1: RYAMG (SEQ ID NO:152),
 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:153),
 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:154); o
 III)
 dicho primer V_HH comprende
- 20 CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:132),
 CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:133),
 CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:134), y
 dicho segundo V_HH comprende
- 25 CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:128),
 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:129),
 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:130); o
 IV)
 dicho primer V_HH comprende
- 30 CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:116),
 CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (SEQ ID NO:117),
 CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:118), y
 dicho segundo V_HH comprende
- CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:112),

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:113),

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:114); o

V)

dicho primer V_HH comprende

5 CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:124),

CDR2: GLRWTDSTEYADSVKG (SEQ ID NO:125),

CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:126), y

dicho segundo V_HH comprende

CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:120),

10 CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:121),

CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:122); o

VI)

dicho primer V_HH comprende

CDR1: IYTMS (SEQ ID NO:108),

15 CDR2: GLRWTDSTEYADSVKG (SEQ ID NO:109),

CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (SEQ ID NO:110), y

dicho segundo V_HH comprende

CDR1: RLAMG (SEQ ID NO:104),

CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:105),

20 CDR3: DDSVGDGYLDY (SEQ ID NO:106)

(definición de Kabat).

125. Una composición farmacéutica que comprende el derivado polipeptídico de ISVD o derivado polipeptídico V_HH de acuerdo con cualquiera de las modalidades 117-124.

25 126. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 125, en donde dicha composición comprende una sal de ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprílico.

127. La composición farmacéutica de acuerdo con las modalidades 126, en donde dicha sal de ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprílico es N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato de sodio (SNAC).

30 128. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 125-127 que comprende además nicotinamida (NAM).

129. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 125-128, en donde dicha composición es una composición sólida.

130. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_HH o composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades 117-129 para su uso en el tratamiento de la hemofilia, tal como hemofilia A con o sin inhibidores, o tal como hemofilia A adquirida.

131. El derivado polipeptídico de ISVD, derivado polipeptídico V_HH o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las modalidades 130, en donde dicho derivado polipeptídico o composición se administra por vía oral.

132. Un método para aumentar la biodisponibilidad oral de un polipéptido de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) o derivado polipeptídico de ISVD procoagulante que comprende un primer ISVD (ISVD1) capaz de unirse al Factor IX (SEQ ID NO:1) o la forma activada de este, un segundo ISVD (ISVD2) capaz de unirse al Factor X (SEQ ID NO:2) o la forma activada de este, un resto de prolongación, opcionalmente un enlazador capaz de enlazar ISVD1 e ISVD2 (“L₁₋₂”), y opcionalmente una o más extensiones (“E”) que comprende las etapas de

a. modificar un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD de manera que se reduzca el punto isoeléctrico de este,

b. cultivar células huésped para expresar el ácido nucleico que codifica el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD,

c. recolectar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped,

d. purificar el polipéptido de ISVD o derivado polipeptídico de ISVD del cultivo de células huésped mediante el uso de cromatografía estándar, y

e. unir un resto de prolongación al polipéptido de ISVD, a menos que dicho resto ya esté presente.

En una modalidad preferida, el compuesto obtenido mediante el uso de dicho método para aumentar la biodisponibilidad oral de un polipéptido de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) o derivado de polipéptido de ISVD procoagulante se formula en una composición farmacéutica que comprende SNAC y, opcionalmente, también NAM.

En una modalidad preferida, un derivado polipeptídico de ISVD, comprende un ISVD anti-FX conectado a un ISVD V_HH anti-FIX(a) en una dirección N-terminal a C-terminal (N- a C-terminal).

En una modalidad preferida de este tipo, un derivado polipeptídico de ISVD, comprende un fragmento V_HH anti-FX conectado a un fragmento V_HH anti-FIX(a) en una dirección N-terminal a C-terminal (N- a C-terminal), ver, por ejemplo, las Figuras 2a, 2b y 3a-f.

En modalidades preferidas, los ISVD o fragmentos V_HH capaces de unirse al FIX(a) se unen preferentemente al FIX activado (FIXa).

En una modalidad, el derivado polipeptídico de ISVD, tal como un derivado polipeptídico V_{HH} comprende un resto de prolongación que no es capaz de unirse a proteínas/marcadores de la superficie plaquetaria, tal como GPIb-IX, chaperona de colágeno HSP47, efrina B1, proteína tiol isomerasa ERP5, proteína de interacción de la progenitora hematopoyética cinasa 1 de 55 (HIP-55),
5 glicoproteína VI, glicoproteína plaquetaria 1b, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor I de agregación endotelial plaquetaria, CD31, CD36, MARKS, multimerina, integrina alfa IIb/beta 3, transcrito 1 similar al receptor activador expresado en células mieloides (TREM) (TLT-1), cinasa ligada a integrina (ILK), cixina, colágeno, P-selectina, Factor XIII, ligando 1 de glicoproteína P-selectina, integrina alfa 6 beta 1, trombospondina, factor de von Willebrand,
10 G6B, CD42b, proteína de unión a syntaxina 2, fosfatidiletanolamina, fibrinógeno/fibrina, filamina, estomatina, esfingolípido, CD31, CD36, CD40, CD41, CD42c, CD42, CD49b, CD61, CD62P, CD63, CD69, CD107a, CD107b, CD109, CD154, PECAM-1, y/o ERPS.

En una modalidad, el derivado polipeptídico de ISVD, tal como un derivado polipeptídico V_{HH} comprende un resto de prolongación que no es capaz de unirse a polipéptidos asociados a la
15 membrana, tales como glicoproteínas, GPIIb/IIIa, β 2GP1, TLT-1, selectinas, un factor de coagulación o complejo de factor de coagulación y/o una selectina.

En una modalidad, los derivados polipeptídicos de ISVD, tales como los derivados polipeptídicos V_{HH} de la invención, no interfieren con el efecto del FVIII, tal como el FVIII recombinante administrado a un paciente que padece hemofilia A, cuando dichos derivados polipeptídicos se usan
20 en dosis clínicamente relevantes en el tratamiento de la hemofilia A.

Aunque ciertas características de la invención se ilustraron y describieron en la presente descripción, ahora se les ocurrirán muchas modificaciones, sustituciones, cambios, y equivalentes a los expertos en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones adjuntas pretenden cubrir todas las modificaciones y cambios que caen dentro del verdadero espíritu de la invención.

EJEMPLOS

Lista de abreviaturas

AIEX:	Intercambio aniónico
CC:	Coeficiente de correlación de Pearson
30 CDR:	Región determinante de la complementariedad
CHO:	Ovario de hámster chino
CMK:	Clorometilcetona

	EC ₅₀ :	Concentración efectiva media máxima
	EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
	ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
	FACS:	Clasificación de células activadas por fluorescencia
5	FIX:	Factor de coagulación IX
	FIXa:	Factor de coagulación IXa
	FX:	Factor de coagulación X
	FXa:	Factor de coagulación Xa
	FR:	Región marco
10	GS:	Glutamina sintetasa
	HA:	Hemofilia A
	HB:	Hemofilia B
	ISVD:	Dominio variable único de inmunoglobulina
	IV:	Por vía intravenosa
15	KO:	Inactivación
	MSX:	L-metionina sulfoximina
	MRTHL:	Vida media terminal tiempo medio de residencia
	NAM:	Nicotinamida
	OEG:	ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico
20	PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
	PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
	pI:	Punto isoeléctrico
	PK:	Farmacocinética
	PO:	Por vía peroral
25	RUTA:	Regresión robusta y eliminación de valores atípicos (función GraphPad Prism)
	RMS:	Raíz cuadrada media
	RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
	RP-UPLC:	Cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa
	SIA:	Análogo de secuencia idéntica
30	SC:	Subcutánea
	SNAC:	N-(8-[2-hidroxibenzoil]amino)caprilato de sodio
	SPR:	Resonancia de plasmones superficiales

TGT: Prueba de generación de trombina
 TLS: Translación-libración-atornillado-rotación
 TVT: Transección de la vena de la cola
 UPLC: Cromatografía líquida de ultra rendimiento

5 Ejemplo 1: Métodos generales y preparación de fragmentos V_HH y otras proteínas recombinantes
 Biología molecular general

Para técnicas generales de biología molecular, ver Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4^{ta} edición, 2014, Sambrook, Fritsch y Maniatis eds., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY EE. UU.).

Inmunizaciones y bibliotecas

- 10 Después de la aprobación del Comité de Ética de Ablynx Camelid Facility (LA1400575), dos llamas y dos alpacas se inmunizaron con FIX y FX humano (Haemotologic Technologies, VT EE. UU.), respectivamente.

La clonación de los repertorios de fragmentos de anticuerpos de solo cadena pesada y la preparación de bibliotecas inmunitarias de fagos se realizó de la siguiente manera.

- 15 Después de la inyección final del inmunógeno, se recolectaron muestras de sangre. A partir de estas muestras de sangre, se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante el uso de Ficoll-Hypaque de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.). De las PBMC, se extrajo y usó ARN total como material de partida para RT-PCR para amplificar los segmentos de ADN que codifican fragmentos V_HH, esencialmente como
- 20 se describe en el documento WO2005/044858. En resumen, los fragmentos de ADN que codifican fragmentos V_HH se clonaron en el vector fagémido pAX212, lo que permite la producción de partículas de fagos que muestran fragmentos V_HH fusionados con etiquetas His₆ y FLAG₃. Subsecuentemente, los fagos se prepararon y almacenaron de acuerdo con protocolos estándar.

Bibliotecas sintéticas

- 25 Las bibliotecas sintéticas se generaron mediante la clonación de fragmentos génicos V_HH sintéticos obtenidos y clonados a partir de las inmunizaciones en el vector fagémido pAX190, que tiene las mismas características que el pAX212 descrito anteriormente, pero con diferencias en el sitio de clonación múltiple.

Cribado de bibliotecas de fragmentos V_HH que se unen a FX o FIX

- 30 Las selecciones de la presentación de fagos del fragmento V_HH se realizaron con las bibliotecas inmunitarias y sintéticas generadas. Las bibliotecas se sometieron a una a cuatro rondas sucesivas de enriquecimiento contra diferentes concentraciones de FIX y FX humanos inmovilizados para

enriquecer el cribado de clones para obtener mejores aglutinantes a FIX y FX (Haemotologic Technologies, VT EE. UU.) y FIX y FX de cynomolgus (generados internamente por Novo Nordisk). Para enriquecer específicamente los fragmentos V_HH que fueran selectivos para FIXa y FX frente a FIX y FXa, respectivamente, en ciertos experimentos se usó un exceso de FIX y FXa solubles para la competencia durante la incubación de las bibliotecas con el FIXa y FX inmovilizados.

Para enriquecer específicamente los fragmentos V_HH que fueron selectivos para FIX y FX frente a otros factores de coagulación estructuralmente relacionados, en ciertos experimentos se usó un exceso de FX y FIX solubles, respectivamente, para la competencia durante la incubación de las bibliotecas con el FIX y FX inmovilizados.

Se cribaron aproximadamente 4500 clones individuales de los resultados de selección para determinar la unión en ELISA (mediante el uso de extractos periplasmáticos de células de *E. coli* que expresan los fragmentos V_HH) contra FX, FXa, FIX y FIXa humanos y de cynomolgus. Se identificaron aproximadamente 1500 clones, cada uno de los cuales mostró una unión específica a FX y FIXa/FIX humanos, de los cuales la mayoría mostró unión cruzada con FX y FIX de cynomolgus. Algunos clones mostraron una unión preferencial por FX frente a FXa y FIXa frente a FIX. El análisis de secuencias de los clones positivos por ELISA identificó aproximadamente 700 secuencias únicas de fragmentos V_HH que se unen a FIXa/FIX o FX/FXa. Para optimizar aún más los compuestos, se realizaron mutagénesis intensivas de CDR y FR de V_HH combinadas con adiciones de prolongador, combinaciones de enlazador y extensión con enfoque en potenciar la potencia hemostática mediante cribados de mutaciones mediante el uso de un ensayo de generación de trombina, evitar la disposición farmacológica mediada por el objetivo mediante el cribado de compuestos con afinidades alteradas, reducir la inmunogenicidad mediante el cribado de los sitios de riesgo mediante un ensayo proteómico de péptidos asociados al MHC y potenciar la biodisponibilidad oral *in vivo* mediante sustituciones que reducen el pI de los residuos expuestos en la superficie.

Generación de constructos de expresión de fragmentos V_HH que se unen a FX o FIX

El análisis de secuencia de fragmentos V_HH a partir de los resultados de selección de presentación de fagos se realizó de acuerdo con procedimientos comúnmente conocidos (Pardon y otros (2014) Nat Protoc 9: 674).

Los fragmentos de ADN que contienen fragmentos V_HH, obtenidos mediante PCR con combinaciones específicas de cebadores FR1 directos y FR4 inversos, cada uno portador de un sitio de restricción único, se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y se ligaron en los

casetes de clonación coincidentes de vectores de expresión de polipéptidos V_HH como formatos etiquetados con His₆ y/o FLAG₃ para expresión en *E. coli* o *P. pastoris*. Las mezclas de ligadura se transformaron después en *Escherichia coli* Células TG1 (60502, Lucigen, Middleton, WI) o TOP10 (C404052, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) que después se cultivaron bajo la presión de selección antibiótica apropiada (kanamicina o zeocina). Los clones resistentes se verificaron mediante secuenciación de Sanger de un ADN plasmídico (LGC Genomics, Berlín, Alemania).

Expresión genérica de fragmentos V_HH que se unen a FX o FIX en *E. coli*

Los fragmentos V_HH se expresaron en *E. coli* TG1 de un vector de expresión plasmídico que contiene el *lac* promotor, un gen de resistencia a kanamicina, un *E. coli* origen de replicación y un sitio de clonación de fragmentos V_HH precedido por la secuencia codificante para el péptido señal OmpA. En marco con la secuencia codificante del polipéptido V_HH, el vector codifica una etiqueta C-terminal FLAG₃ e His₆. El péptido señal dirige los fragmentos V_HH expresados al compartimiento periplasmático del huésped bacteriano.

Las células *E. coli* TG-1 que contenían los constructos de fragmentos V_HH de interés se cultivaron durante 2 horas a 37 °C seguido de 29 horas a 30 °C en matraces agitadores con deflectores que contenían medio de autoinducción “5052” (glicerol al 0.5 %, glucosa al 0.05 %, lactosa al 0,2 % + MgSO₄ 3 mM). Los gránulos celulares congelados durante la noche de cultivos de expresión de *E. coli* se disolvieron a continuación en PBS (1/12.5 del volumen de cultivo original) y se incubaron a 4 °C durante 1 hora mientras se giraban suavemente. Finalmente, las células se sedimentaron una vez más y el sobrenadante, que contenía las proteínas secretadas hacia el espacio periplasmático, se almacenó.

Expresión genérica de fragmentos V_HH en *P. pastoris*

Las células de *P. pastoris* que contienen constructos de fragmentos V_HH de interés se cultivaron durante dos días (a 30 °C, 200 rpm) en medio BGCM. El tercer día, el medio se cambió a BMCM y los constructos se cultivaron aún más (a 30 °C, 200 rpm) e indujeron con metanol al 0.5 % v/v después de 8 horas. Al día siguiente, los constructos se indujeron con metanol al 0.5 % v/v por la mañana, al mediodía y por la noche. El quinto día, las células se centrifugaron y se recogió el sobrenadante (que contenía el fragmento V_HH secretado).

Expresión genérica de V_HH y anticuerpos que se unen a FX o FIX y otras proteínas recombinantes en células HEK

Los plásmidos de expresión para la expresión transitoria en células HEK293 se adquirieron de Twist Biosciences o Thermo Fisher Scientific. Los plásmidos de Twist Biosciences se basaron en el vector

pTT descrito en Durocher, Y. y otros., (2002) *Nucleic Acid Res*, 30: E9 mientras que los plásmidos de ThermoFisherScientific se basaron en el vector pADNc34-Topo (Thermo Fisher Scientific). Los compuestos polipeptídicos V_HH etiquetados o no con His₆ se transfectaron en células en suspensión HEK293 para expresar transitoriamente polipeptidos V_HH. Los constructos de expresión equivalentes que albergan secuencias que codifican anticuerpos anti-GLA FIX y anti-GLA FX (generados internamente por Novo Nordisk), emicizumab (Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza) análogo de secuencia idéntica (SIA) y Mim8 (Novo Nordisk, Dinamarca) también se expresaron en HEK293 mediante el uso del método descrito a continuación.

La transfección transitoria de células en suspensión HEK293 (sistema de expresión Expi293, Thermo Fisher Scientific, número de catálogo A14635) se realizó esencialmente siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células HEK293 se subcultivaron típicamente cada 3-4 días en medio de expresión Expi293 (Gibco, número de catálogo A14351-01) complementado con P/S al 1 % (GIBCO, número de catálogo 15140-122). Las células HEK293 se transfectaron a una densidad celular de 2.5-3 mill/ml mediante el uso de Expifectamina. Para cada litro de células HEK293, la transfección se realizó mediante dilución de un total de 1 mg de ADN plasmídico en 50 ml de Optimem (GIBCO, número de catálogo 51985-026, dilución A) y mediante dilución de 2.7 ml de Expifectamina en 50 ml de Optimem (dilución B). Para las cotransfecciones (es decir, para anticuerpos), se usaron plásmidos en una relación de 1:1. Las diluciones A y B se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10-20 minutos. La mezcla de transfección se añadió a las células HEK293 y las células se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con rotación orbital (85-140 rpm). Un día después de la transfección, las células transfectadas se complementaron con 5 ml del potenciador de la transfección ExpiFectamina 293 1 y 50 ml del potenciador de la transfección ExpiFectamina 293 2. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recolectaron, típicamente, 4-5 días después de la transfección por centrifugación seguido de filtración.

Expresión genérica de fragmentos V_HH y anticuerpos que se unen a FX y FIX(a) en células CHO Los compuestos y los anticuerpos V_HH anti-FIX y anti-FX se produjeron en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante el uso de selección de sintetasa de glutamina (GS). Las células CHO se transfectaron con plásmidos de expresión de GS mediante el uso de electroporación y, a continuación, se sometieron a selección mediante el uso de privación de glutamina junto con suplemento de MSX en medio CD-CHO (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo 10743029). Los grupos de células CHO estables se obtuvieron típicamente después de 3 semanas de cultivo y los grupos se clonaron a partir de células individuales en placas de 384 pocillos. Los clones de CHO

que surgieron en placas de 384 pocillos se expandieron típicamente en placas de 96 pocillos y se cribaron para determinar la productividad. Los clones productores seleccionados se aumentaron para el cultivo en biorreactores a escala de 1 l a 15 l mediante el uso de un medio de cultivo celular patentado predefinido (Novo Nordisk A/S). La viabilidad celular se mantuvo alta durante el cultivo con una disminución progresiva después de esto hasta la cosecha del cultivo celular. Aquí, los sobrenadantes celulares se clarificaron mediante centrifugación y/o filtración con filtro de profundidad mediante el uso de filtros MD0HC23CL3 y MX0HC01FS1 (Millipore) en dependencia de la escala de cultivo antes de proceder con la purificación de proteínas basada en cromatografía.

Purificación y caracterización Genérica de fragmentos V_HH que se unen a FX o FIX

- 10 Los compuestos de V_HH etiquetados con His6 o no etiquetados se purificaron mediante resina MabSelectSure Protein-A (Cytiva) o cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC) en resina Ni-Excel (Cytiva) con imidazol (para esta última) o elución ácida (para la primera) seguido de una etapa de desalación (columnas PD con resina Sephadex G25, Cytiva) y, si es necesario, cromatografía de filtración en gel (columna Superdex200, Cytiva) en PBS o HBS. Los compuestos
- 15 de V_HH no etiquetados con His6 y anticuerpos dirigidos a los dominios GLA de FIX y FX, respectivamente (generados internamente en Novo Nordisk) y SIA de emicizumab (Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza) se purificaron mediante resinas de proteína A MabSelectSure (Cytiva) o resinas multimodales (Cytiva) con elución ácida seguida de una etapa de desalación (por ejemplo, columnas PD con resina Sephadex G25, Cytiva) y, si es necesario, cromatografía de filtración en gel (por
- 20 ejemplo, columna Superdex200, Cytiva) en PBS o HBS. La integridad de la proteína se analizó mediante el uso de una configuración del método de cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) en un sistema Agilent LC 1100/1200 y mediante el uso de BIOSEP (columna para la separación de moléculas)-SEC-53000 de 300x7,8 mm (Phenomenex, núm. cat. OOH-2146-K0) y un tampón de corrida compuesto de fosfato de Na 200 mM pH 6.9, NaCl
- 25 300 mM e isopropanol al 10 %. Las masas moleculares de los lotes de polipéptidos V_HH se analizaron mediante el uso de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por electropulverización (ESI-TOF-MS) en un sistema Agilent 6280 (Agilent Technologies) con una columna de desalación MassPREP (Waters) ejecutada a 0.4 ml/min en tampón A compuesto de MQ-H₂O/ácido fórmico al 0.1 % y tampón B compuesto de acetonitrilo/ácido fórmico al 0.1 % para la
- 30 elución por etapas. Para medir la concentración de proteína final, se usó un espectrofotómetro NanoDropTM (Thermo Scientific) con coeficientes de extinción calculados teóricamente.

Ejemplo 2: Conjugación del resto de prolongación al residuo de cisteína del polipéptido V_HH

Para prolongar los polipéptidos V_HH para mejorar las propiedades farmacocinéticas, los compuestos polipeptídicos V_HH se manipularon por ingeniería genética para comprender sustituyentes de cisteína (Cys) en varias posiciones de la cadena principal, por ejemplo, en extensiones N- o C-terminales con uno o dos residuos de Cys introducidos usados para la conjugación con uno o más
5 restos de prolongación de ácidos grasos como se describe más abajo.

Para unir el resto de prolongación a los compuestos de polipéptidos V_HH, se usó un reactivo intermedio en forma de un resto de prolongación modificado.

El reactivo intermedio que comprende el resto de prolongación se preparó como se describe en el documento WO2016/102562 y ejemplos no limitantes de dichos reactivos intermedios se muestran
10 en la tabla 3 más abajo:

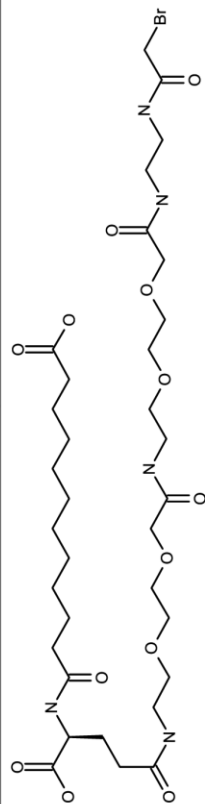
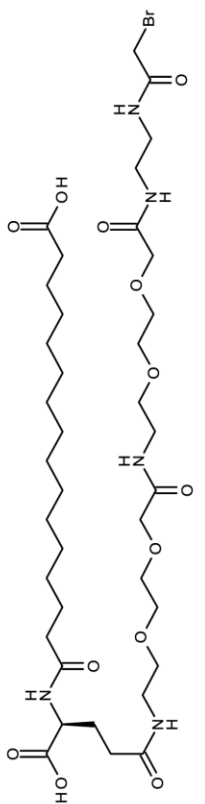
15

20

25

30

Tabla 3: Ejemplos de reactivos intermedios que comprenden restos de prolongación (incl. enlazador (L_p))

ID	Estructura de reactivos intermedios y nombre IUPAC (nombre abreviado)	ID de derivado polipeptídico V _{HH}
C1	 11-({(S)-1-carboxi-3-[2-(2-{[2-(2-bromoacetyl-amino)ethylcarbamoyl]methoxy}ethylethylcarbamoyl]propylcarbamoyl}undecanoic acid) reactivo enlazador diácido C12)	Cpto #65
C2	 15-({(S)-1-carboxi-3-[2-(2-{[2-(2-bromoacetyl-amino)ethylcarbamoyl]methoxy}ethylethylcarbamoyl]propylcarbamoyl}pentadecanoic acid) reactivo enlazador diácido C16)	Cpto #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #21, #22

5

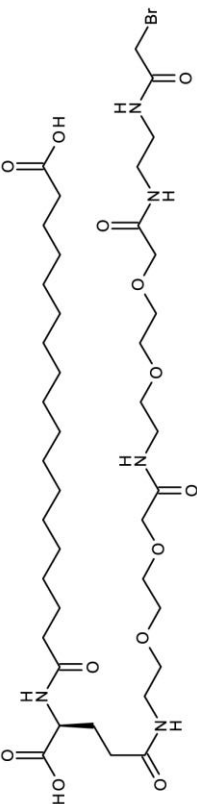
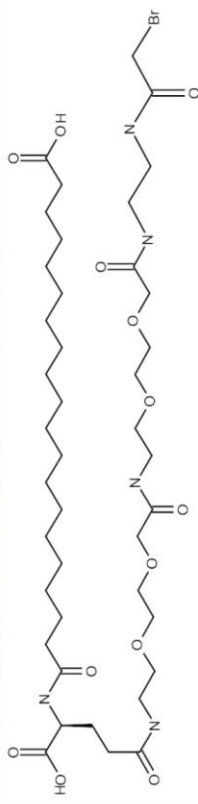
10

15

20

25

30

C3	 17-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-{[2-(2-bromoacetyl-amino)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]heptadecanoico (reactivo enlazador diácido C18)	Cpto #4, #5, #24, #26, #28, #30, #32, #34, #36, #38, #40, #58, #59, #60, #61, #62, #63, #66
C4	 19-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-{[2-(2-bromoacetyl-amino)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico (reactivo enlazador diácido C20)	Cpto #67

Conjugación, purificación y análisis

A la solución de agua que contiene el polipéptido V_HH con uno o más residuos de cisteína introducidos para la conjugación, se añadió 5 eq. de BSPP (sal de bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dihidrato de dipotasio) o 1.1 eq de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina)) por cisteína con tapón. Después de 1-2 h de agitación, se ajustó el pH a 8.5 con NaOH y 5 eq. de, por ejemplo, el reactivo intermedio C1 en NaHCO 0.1 M₃ (ac.) por cisteína libre en el polipéptido V_HH respectivo. La mezcla se agitó suavemente durante 1.5-16 horas en la oscuridad. La mezcla de reacción se diluyó con agua antes de la purificación por el método de intercambio aniónico (AIEX) mediante el uso de un sistema Äkta. El polipéptido V_HH con la conjugación de la cadena lateral se purificó mediante el uso de un método de separación de cromatografía de AIEX. Por tanto, la resina de AIEX Source 30Q empaquetada en una columna adecuada se usó junto con una configuración de programa de gradiente de cloruro de sodio en un sistema de cromatografía Äkta Avant. Los sistemas tampón usados fueron un tampón de equilibrio compuesto de Hepes 20 mM, pH 8.5 y un tampón de elución compuesto de Tris 20 mM, pH 8.5, NaCl 1 M. La mezcla de reacción se ajustó a pH 8.5 y se diluyó a una conductividad por debajo de 4 mS/cm mediante el uso de MilliQ-H₂O o tampón de equilibrio. La muestra se aplicó a la columna y la columna se lavó después de la aplicación con 5 a 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio. A continuación se realizó la cromatografía de separación mediante el uso de un gradiente superficial de 30 a 50 volúmenes de columna. El gradiente usado fue de 0 % y hasta 50 % en dependencia del pI del derivado polipeptídico V_HH que se purificó. Generalmente, los polipéptidos V_HH parentales no conjugados se eluyeron temprano en el gradiente, los polipéptidos V_HH con conjugación única eluyen en el medio del gradiente y los polipéptidos V_HH con multiconjugaciones, lo que significa más de una conjugación de cadena lateral por molécula de polipéptido V_HH, eludida tarde en el gradiente. El agrupamiento de fracciones sobre el pico principal se realizó de una forma, de manera que se obtuvieron altas purezas entre el 90 al 99 % del polipéptido V_HH con preparaciones de conjugado simple o doble. El análisis de pureza se realizó mediante el uso de un método de cromatografía líquida de ultrarrendimiento de fase inversa (RP-UPLC) basado en la columna HALO DiPhenyl 1,000 Å, 2.7 µm, 150x2.1 mm (Scantec Nordic USDPF001316) y tampones de corrida compuestos de A) TFA al 0.1 % v/v en agua y B) TFA al 0.09 % v/v en configuración de acetonitrilo en un sistema Waters Acquity UPLC con detector de UV y FLD. La temperatura de la columna se fijó en 60 °C. El programa de gradiente fue 1) 0.0-8.0 min: 20-50 % de B, 2) 8.0-8.1 min: 50-80 % de B, 3) 8.1-9.0 min: 80 % de B, 4) 9.0-9.1 min: 80-20 % de B y 5) 9.1-11.0 min: 20 % de B. El polipéptido V_HH parental no conjugado eluyó entre 4.6-4,8

min. El derivado polipeptídico V_HH con conjugación única eluyó entre 5.1-5.6 min con el pico principal a aproximadamente 5.3 min. El derivado polipeptídico V_HH con doble conjugación eluyó entre 5.7-5,8 y posteriormente para polipéptidos V_HH multiconjugados fuera del sitio. La integridad de los polipéptidos V_HH con conjugación(ones) se analizó mediante el uso de un método de SE-HPLC configurado en un sistema Agilent LC 1100/1200 y una columna BIOSEP-SEC-3000 de 300×7,8 mm (Phenomenex, núm. cat. OOH-2146-K0) y un tampón de corrida compuesto por fosfato de Na 200 mM, pH 6.9, NaCl 300 mM e isopropanol al 10 %. Las masas moleculares de polipéptido V_HH con conjugación(ones) se analizaron mediante el uso de ESI-TOF-MS en un sistema Agilent 6280 (Agilent Technologies) con una columna de desalación MassPREP (Waters) que se ejecutó a 0.4 ml/min en un tampón A compuesto de MilliQ-H₂O/0.1 % de ácido fórmico y tampón B compuesto de acetonitrilo/0.1 % de ácido fórmico para la elución de la etapa. El mapeo peptídico para la verificación de la secuencia se realizó mediante el uso de una combinación de digestiones basadas en quimotripsina y tripsina. El sistema de LC-MS consistió en un Waters Acquity UPLC combinado con un instrumento Thermo Orbitrap Fusion. El análisis de LC-MS en línea de los digestos se realizó mediante el uso de una columna CSH C-18 1.7 µm, 150x2.1 mm y un gradiente de acetonitrilo/ácido fórmico. La temperatura de la columna fue de 60 °C. Tampón A: 0.1 % de FA en agua y tampón B: 0.1 % FA Acetonitrilo. El programa de gradiente fue: 1) 0.0-2.0 min: 1 % de B, 2) 2-50 min: 1-35 % de B, 3) 50-51 min: 100 % B y 4) 51-60 min: 100-1 % B con un flujo de 120 µl/min. Los datos se analizaron mediante el uso de un flujo de trabajo de mapeo de péptidos Genedata Refiner. Se obtuvo una cobertura completa de la secuencia primaria. Para medir la concentración de proteínas de preparaciones de lotes del derivado polipeptídico V_HH con conjugación(ones), se usó un espectrofotómetro NanoDropTM (Thermo Scientific) con coeficientes de extinción calculados teóricamente.

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran, con un nivel creciente de detalles, ejemplos no limitantes de derivados polipeptídicos ISVD y V_HH.

Ejemplo 3: Tablas de secuencias y polipéptidos V_HH anti-FX/anti-FIX(a)

Tabla 4: Descripción general de compuestos y SEQ ID NO (secuencias de V_HH y CDR) sin transportador

	Extensión N-term.	V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)	V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
Polipéptido V _H H ID	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO
Cpto #1 (monovalente)	ninguno	VHH-1.1	27 (28,29,30)	ninguno	ninguno	ninguno	5
Cpto #2 (monovalente)	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	VHH-2.2	35 (36,37,38)	6
Cpto #3 (monovalente)	ninguno	VHH-1.3	31 (32,33,34)	ninguno	ninguno	ninguno	6
Cpto #4	ninguno	VHH-1.4	39 (40,41,42)	14	VHH-2.4	43 (44,45,46)	7
Cpto #5	ninguno	VHH-1.5	47 (48,49,50)	14	VHH-2.5	51 (52,53,54)	7
Cpto #6	ninguno	VHH-1.6	47 (48,49,50)	14	VHH-2.6	51 (52,53,54)	8
Cpto #7	ninguno	VHH-1.7	63 (64,65,66)	20	VHH-2.7	67 (68,69,70)	9
Cpto #8	ninguno	VHH-1.8	63 (64,65,66)	20	VHH-2.8	51 (52,53,54)	9
Cpto #9	ninguno	VHH-1.9	79 (80,81,82)	20	VHH-2.9	83 (84,85,86)	9

30 25 20 15 10 5

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.		V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)	V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO	V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)		ID V _H H	SEQ ID NO	
Cpto #10	ninguno	VHH-1.10	87 (88,89,90)		20	VHH-2.10	67 (68,69,70)	9
Cpto #11	ninguno	VHH-1.11	95 (96,97,98)		20	VHH-2.11	83 (84,85,86)	9
Cpto #12	ninguno	VHH-1.12	103 (104,105,106)		20	VHH-2.12	107 (108,109,110)	9
Cpto #13	ninguno	VHH-1.13	111 (112,113,114)		20	VHH-2.13	115 (116,117,118)	9
Cpto #14	ninguno	VHH-1.14	119 (120,121,122)		20	VHH-2.14	123 (124,125,126)	9
Cpto #15	ninguno	VHH-1.15	127 (128,129,130)		20	VHH-2.15	131 (132,133,134)	9
Cpto #16	ninguno	VHH-1.16	111 (112,113,114)		20	VHH-2.16	139 (140,141,142)	9
Cpto #17	ninguno	VHH-1.17	143 (144,145,146)		20	VHH-2.17	107 (108,109,110)	9
Cpto #18	ninguno	VHH-1.18	151 (152,153,154)		20	VHH-2.18	155 (156,157,158)	9

30 25 20 15 10 5

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.		V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)		V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO		
Cpto #19	ninguno	VHH-1.19	159 (160,161,162)	20	VHH-2.19	51 (52,53,54)	9		
Cpto #20	ninguno	VHH-1.20	167 (168,169,170) 79	20	VHH-2.20	171 (172,173,174)	9		
Cpto #21	ninguno	VHH-1.21	(80,81,82)	20	VHH-2.21	107 (108,109,110)	9		
Cpto #22	ninguno	VHH-1.22	111 (112,113,114)	20	VHH-2.22	83 (84,85,86)	9		
Cpto #23	690	VHH-1.23	191 (192,193,194)	14	VHH-2.23	43 (44,45,46)	10		
Cpto #24	690	VHH-1.24	191 (192,193,194)	14	VHH-2.24	43 (44,45,46)	10		
Cpto #25	690	VHH-1.25	207 (208,209,210)	14	VHH-2.25	43 (44,45,46)	11		
Cpto #26	690	VHH-1.26	207 (208,209,210)	14	VHH-2.26	43 (44,45,46)	11		

5
10
15
20
25
30

Polipeptido V _H H ID	Extensión N-term.		V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)		V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO		
Cpto #27	690	VHH-1.27	223 (224,225,226)	14	VHH-2.27	227 (228,229,230)	11		
Cpto #28	690	VHH-1.28	223 (224,225,226)	14	VHH-2.28	227 (228,229,230)	11		
Cpto #29	690	VHH-1.29	223 (224,225,226)	14	VHH-2.29	243 (244,245,246)	11		
Cpto #30	690	VHH-1.30	223 (224,225,226)	14	VHH-2.30	243 (244,245,246)	11		
Cpto #31	690	VHH-1.31	223 (224,225,226)	14	VHH-2.31	259 (260,261,262)	11		
Cpto #32	690	VHH-1.32	223 (224,225,226)	14	VHH-2.32	259 (260,261,262)	11		
Cpto #33	690	VHH-1.33	223 (224,225,226)	14	VHH-2.33	275 (276,277,278)	11		
Cpto #34	690	VHH-1.34	223 (224,225,226)	14	VHH-2.34	275 (276,277,278)	11		

5

10

15

20

25

30

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.		V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)		V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.	
	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO		
Cpto #35	690	VHH-1.35	223 (224,225,226)	14	VHH-2.35	291 (292,293,294)		11		
Cpto #36	690	VHH-1.36	223 (224,225,226)	14	VHH-2.36	291 (292,293,294)		11		
Cpto #37	690	VHH-1.37	223 (224,225,226)	14	VHH-2.37	307 (308,309,310)		11		
Cpto #38	690	VHH-1.38	223 (224,225,226)	14	VHH-2.38	307 (308,309,310)		11		
Cpto #39	690	VHH-1.39	223 (224,225,226)	14	VHH-2.39	323 (324,325,326)		11		
Cpto #40	690	VHH-1.40	223 (224,225,226)	14	VHH-2.40	323 (324,325,326)		11		
Cpto #41	ninguno	VHH-1.41	335 (336,337,338)	16	VHH-2.41	51 (52,53,54)		7		
Cpto #42	ninguno	VHH-1.42	335 (336,337,338)	17	VHH-2.42	51 (52,53,54)		7		

30 25 20 15 10 5

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.	V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)	V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.	
		SEQ ID NO	ID V _H H		SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	ID V _H H		SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)
Cpto #43	ninguno		VHH-1.43	335 (336,337,338)	18	VHH-2.43	51 (52,53,54)	7
Cpto #44	ninguno		VHH-1.44	335 (336,337,338)	19	VHH-2.44	51 (52,53,54)	7
Cpto #45	ninguno		VHH-1.45	335 (336,337,338)	20	VHH-2.45	51 (52,53,54)	7
Cpto #46	ninguno		VHH-1.46	335 (336,337,338)	14	VHH-2.46	379 (380,381,382)	7
Cpto #47	ninguno		VHH-1.47	335 (336,337,338)	16	VHH-2.47	379 (380,381,382)	7
Cpto #48	ninguno		VHH-1.48	335 (336,337,338)	21	VHH-2.48	379 (380,381,382)	7
Cpto #49	ninguno		VHH-1.49	335 (336,337,338)	18	VHH-2.49	379 (380,381,382)	7
Cpto #50	ninguno		VHH-1.50	335 (336,337,338)	19	VHH-2.50	379 (380,381,382)	7

5

10

15

20

25

30

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.	V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L _{1,2})	V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
		ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)		ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	
Cpto #51	ninguno	VHH-1.51	335 (336,337,338)	14	VHH-2.51	419 (420,421,422)	7
Cpto #52	ninguno	VHH-1.52	335 (336,337,338)	16	VHH-2.52	419 (420,421,422)	7
Cpto #53	ninguno	VHH-1.53	335 (336,337,338)	23	VHH-2.53	419 (420,421,422)	7
Cpto #54	ninguno	VHH-1.54	335 (336,337,338)	21	VHH-2.54	419 (420,421,422)	7
Cpto #55	ninguno	VHH-1.55	335 (336,337,338)	18	VHH-2.55	419 (420,421,422)	7
Cpto #56	ninguno	VHH-1.56	335 (336,337,338)	19	VHH-2.56	419 (420,421,422)	7
Cpto #57	ninguno	VHH-1.57	335 (336,337,338)	20	VHH-2.57	419 (420,421,422)	7
Cpto #58	ninguno	VHH-1.58	471 (472,473,474)	14	VHH-2.58	475 (476,477,478)	7

30 25 20 15 10 5

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.		V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)		V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	SEQ ID NO		
Cpto #59	ninguno	VHH-1.59	479 (480,481,482)	14	VHH-2.59	51 (52,53,54)		7	
Cpto #60	ninguno	VHH-1.60	487 (488,489,490)	14	VHH-2.60	475 (476,477,478)		7	
Cpto #61	ninguno	VHH-1.61	495 (496,497,498)	14	VHH-2.61	499 (500,501,502)		7	
Cpto #62	ninguno	VHH-1.62	503 (504,505,506)	14	VHH-2.62	507 (508,509,510)		7	
Cpto #63	ninguno	VHH-1.63	511 (512,513,514)	14	VHH-2.63	507 (508,509,510)		7	
Cpto #64	690	VHH-1.64	223 (224,225,226)	14	VHH-2.64	43 (44,45,46)		10	
Cpto #65	690	VHH-1.65	223 (224,225,226)	14	VHH-2.65	43 (44,45,46)		10	
Cpto #66	690	VHH-1.66	223 (224,225,226)	14	VHH-2.66	43 (44,45,46)		10	

30 25 20 15 10 5

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.		V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂)	V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)	ID V _H H		SEQ ID NO V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)		
Cpto #67	690	VHH-1.67	223 (224,225,226)	14	VHH-2.67	43 (44,45,46)	10	
Cpto #68	690	VHH-1.68	223 (224,225,226)	14	VHH-2.68	43 (44,45,46)	10	
Cpto #69	ninguno	VHH-1.69	39 (40,41,42)	14	VHH-2.69	43 (44,45,46)	7	
Cpto #70	3	VHH-1.70	223 (224,225,226)	14	VHH-2.70	43 (44,45,46)	11	
Cpto #71	4	VHH-1.71	223 (224,225,226)	14	VHH-2.71	43 (44,45,46)	11	
Cpto #72	ninguno	VHH-1.72	223 (224,225,226)	14	VHH-2.72	43 (44,45,46)	12	
Cpto #73	ninguno	VHH-1.73	223 (224,225,226)	14	VHH-2.73	43 (44,45,46)	13	
Cpto #74	690	VHH-1.74	599 (600,601,602)	691	VHH-2.74	603 (604,605,606)	7	

Polipéptido V _H H ID	Extensión N-term.		V _H H anti-FX (N-terminal)		Enlazador (L ₁₋₂) SEQ ID NO	V _H H anti-FIX(a) (C-terminal)		Extensión C-term.
	SEQ ID NO	ID V _H H	SEQ ID NO	V _H H (CDR1, 2, 3) (definición de Kabat)		ID V _H H	SEQ ID NO	
Cpto #75	ninguno	VHH-1.75	607 (608,609,610)	14	VHH-2.75	35 (36,37,38)	ninguno	ninguno
Cpto #76 (monovalente)	ninguno	VHH-1.15	127 (128,129,130)	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	11
Cpto #77 (monovalente)	ninguno	VHH-1.13	111 (112,113,114)	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	11

Tabla 5: Descripción general de derivados polipeptídicos V_HH anti-FX/anti-FIX(a) (incluye el resto de prolongación)

ID del polipéptido V _H H	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (L _P)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1(/R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #1	Ninguno	Ninguno	Ninguno	615
Cpto #2	Ninguno	Ninguno	Ninguno	616
Cpto #3	Ninguno	Ninguno	Ninguno	617

30 25 20 15 10 5

ID del polipéptido VHH	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (LP)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1/(R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #4	P3	L _p 1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	618
Cpto #5	P3	L _p 1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	619
Cpto #6	P2	L _p 1	Cys5 y Cys7 en extensión C-term (SEQ ID NO:8)	620
Cpto #7	P2	L _p 1	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	621
Cpto #8	P2	L _p 1	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	622
Cpto #9	P2	L _p 1	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	623
Cpto #10	P2	L _p 1	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	624
Cpto #11	P2	L _p 1	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	625
Cpto #12	P2	L _p 1	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	626

30 25 20 15 10 5

ID del polipéptido VHH	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (LP)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1/(R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #13	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	627
Cpto #14	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	628
Cpto #15	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	629
Cpto #16	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	630
Cpto #17	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	631
Cpto #18	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	632
Cpto #19	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	633
Cpto #20	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	634
Cpto #21	P2	L _{P1}	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	635

30 25 20 15 10 5

ID del polipéptido VHH	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (LP)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1/(R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #22	P2	L _P 1	Cys4 y Cys6 en extensión C-term (SEQ ID NO:9)	636
Cpto #23	Ninguno	Ninguno	Ninguno	637
Cpto #24	P3	L _P 1	Cys10 en extensión C-term (SEQ ID NO:10)	638
Cpto #25	Ninguno	Ninguno	Ninguno	639
Cpto #26	P3	L _P 1	Cys30 en cpto#26 (SEQ ID NO:640)	640
Cpto #27	Ninguno	Ninguno	Ninguno	641
Cpto #28	P3	L _P 1	Cys158 en cpto#28 (SEQ ID NO:642)	642
Cpto #29	Ninguno	Ninguno	Ninguno	643
Cpto #30	P3	L _P 1	Cys160 en cpto#30 (SEQ ID NO:644)	644
Cpto #31	Ninguno	Ninguno	Ninguno	645
Cpto #32	P3	L _P 1	Cys161 en cpto#32 (SEQ ID NO:646)	646

30 25 20 15 10 5

ID del polipéptido VHH	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (LP)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1/(R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #33	Ninguno	Ninguno	Ninguno	647
Cpto #34	P3	LP1	Cys188 en cpto#34 (SEQ ID NO:648)	648
Cpto #35	Ninguno	Ninguno	Ninguno	649
Cpto #36	P3	LP1	Cys190 en cpto#36 (SEQ ID NO:650)	650
Cpto #37	Ninguno	Ninguno	Ninguno	651
Cpto #38	P3	LP1	Cys209 en cpto#38 (SEQ ID NO:652)	652
Cpto #39	Ninguno	Ninguno	Ninguno	653
Cpto #40	P3	LP1	Cys231 en cpto#40 (SEQ ID NO:654)	654
Cpto #41	Ninguno	Ninguno	Ninguno	655
Cpto #42	Ninguno	Ninguno	Ninguno	656
Cpto #43	Ninguno	Ninguno	Ninguno	657
Cpto #44	Ninguno	Ninguno	Ninguno	658
Cpto #45	Ninguno	Ninguno	Ninguno	659

30 25 20 15 10 5

ID del polipéptido VHH	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (LP)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1/(R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #46	Ninguno	Ninguno	Ninguno	660
Cpto #47	Ninguno	Ninguno	Ninguno	661
Cpto #48	Ninguno	Ninguno	Ninguno	662
Cpto #49	Ninguno	Ninguno	Ninguno	663
Cpto #50	Ninguno	Ninguno	Ninguno	664
Cpto #51	Ninguno	Ninguno	Ninguno	665
Cpto #52	Ninguno	Ninguno	Ninguno	666
Cpto #53	Ninguno	Ninguno	Ninguno	667
Cpto #54	Ninguno	Ninguno	Ninguno	668
Cpto #55	Ninguno	Ninguno	Ninguno	669
Cpto #56	Ninguno	Ninguno	Ninguno	670
Cpto #57	Ninguno	Ninguno	Ninguno	671
Cpto #58	P3	L _P 1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	672
Cpto #59	P3	L _P 1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	673

30 25 20 15 10 5

ID del polipéptido VHH	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (LP)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1(R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #60	P3	Lp1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	674
Cpto #61	P3	Lp1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	675
Cpto #62	P3	Lp1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	676
Cpto #63	P3	Lp1	Cys6 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:7)	677
Cpto #64	Ninguno	Ninguno	Ninguno	678
Cpto #65	P1	Lp1	Cys10 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:10)	679
Cpto #66	P3	Lp1	Cys10 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:10)	680
Cpto #67	P4	Lp1	Cys10 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:10)	681
Cpto #68	P5	Lp2	Cys10 en la extensión C-term. (SEQ ID NO:10)	682
Cpto #69	Ninguno	Ninguno	Ninguno	683

5

10

15

20

25

30

ID del polipéptido VHH	Transportador (P)	Enlazador del resto de prolongación (LP)	Sitio(s) de unión del resto de prolongación ("R1/(R2)")	Cadena principal del compuesto # SEQ ID NO (sin resto de prolongación)
Cpto #70	P6 ("P", "R1")	Lp3 ("P", "Lp", "R1")	Asp1 en VHH-1.70 (SEQ ID NO:567)	684
Cpto #71	P6 ("P", "R1")	Lp4 ("P", "Lp", "R1")	Asp1 en VHH-1.71 (SEQ ID NO:575)	685
Cpto #72	P6 ("R1", "P")	Lp3 ("R1", "Lp", "P")	Ser127 en VHH-2.72 (SEQ ID NO:587)	686
Cpto #73	P6 ("R1", "P")	Lp4 ("R1", "Lp", "P")	Ser127 en VHH-2.73 (SEQ ID NO:595)	687
Cpto #74	Ninguno	Ninguno	Ninguno	688
Cpto #75	Ninguno	Ninguno	Ninguno	689

Ejemplo 4: Epítipo de polipéptidos V_HH anti-FX basado en el experimento ELISA

Para determinar si el epítipo de unión del polipéptido V_HH anti-FX designado “cpto#1” se encuentra dentro del péptido de activación (AP) de FX humano (SEQ ID NO:2), se configuró un ensayo ELISA. Se inmovilizaron 41 fragmentos únicos de péptidos de 12 mer que abarcan los 52 residuos del péptido de activación con separación de un aminoácido en pocillos de placas de microtitulación
5 seguido de incubación con el polipéptido V_HH a analizar, y se realizó la detección del ligando unido mediante la adición de un anticuerpo secundario marcado con HRP.

Los péptidos se conjugaron en el extremo C-terminal a biotina y se usaron 50 µl de solución peptídica de 1 µg/ml para la inmovilización en pocillos discretos de la placa de microtitulación que se recubrió
10 previamente con 1 µg/ml de estreptavidina. Cada pocillo se lavó con tampón de lavado (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2.5 mM, Tween 20 al 0.05 %, pH 8.60) seguido de la adición de 50 µl de 2 µg/ml de polipéptido V_HH anti-FX etiquetado con FLAG o anticuerpo IgG a analizar. Después de 1 hora, se lavó el polipéptido V_HH no unido mediante el uso de tampón de lavado.

El ligando del péptido de activación anti-FX unido se detectó al unirse primero un anticuerpo
15 secundario marcado con HRP (para el polipéptido V_HH etiquetado con FLAG: AcM anti-FLAG M2-peroxidasa (HRP) (Sigma Aldrich, EE. UU.) durante 1 hora y después añadir 100 µl de sustrato de ELISA TMB-1 (Kem-En-Tec Diagnostics, Dinamarca).

Los epítipos mínimos se dedujeron a continuación a partir del conjunto de péptidos que dieron lugar a una señal por encima del valor basal mediante la identificación de la secuencia común cubierta por
20 el conjunto de péptidos (tabla 6) unidos por cada aglutinante de FX. El primer residuo del epítipo se definió por el último aminoácido en el primer péptido consecutivo positivo para ELISA, mientras que el último residuo del epítipo se definió como el primer residuo del último péptido consecutivo positivo para ELISA.

Por tanto, la tabla a continuación muestra la señal de ELISA de péptidos consecutivos que abarcan
25 todo el AP de FX para polipéptidos V_HH anti-FX iniciales analizados correspondientes al Cpto #1. Las señales de ELISA se han normalizado con relación a la señal de fondo.

Las áreas grises marcan las señales de unión positivas usadas para determinar el epítipo mínimo, que se identificaron como la secuencia NPFDLLDF (SEQ ID NO:692).

La secuencia epitópica identificada del péptido de activación de FX para el cpto#1 se usó para
30 experimentos de determinación de la estructura de alta resolución de las interacciones epítipo:parátipo como se describió en el ejemplo 6.

Tabla 6: Identificación de epítipos

	Residuos de epítomos (SEQ ID NO)	Cpto#1
	vacío	1.00
	SVAQATSSSGEA (693)	0.96
	VAQATSSSGEAP (694)	1.02
	AQATSSSGEAPD (695)	0.97
5	QATSSSGEAPDS (696)	0.96
	ATSSSGEAPDSI (697)	0.98
	TSSSGEAPDSIT (698)	0.77
	SSSGEAPDSITW (699)	0.86
	SSGEAPDSITWK (700)	0.88
	SGEAPDSITWKP (701)	0.88
	GEAPDSITWKPY (702)	0.93
	EAPDSITWKPYD (703)	0.97
10	APDSITWKPYDA (704)	1.06
	PDSITWKPYDAA (705)	1.05
	DSITWKPYDAAD (706)	1.08
	SITWKPYDAADL (707)	1.08
	ITWKPYDAADLD (708)	1.10
	TWKPYDAADLDP (709)	1.13
	WKPYDAADLDPT (710)	0.89
15	KPYDAADLDPTE (711)	0.80
	PYDAADLDPTEN (712)	0.83
	YDAADLDPTENP (713)	0.87
	DAADLDPTENPF (714)	0.88
	AADLDPTENPFD (715)	0.88
	ADLDPTENPFDL (716)	0.91
	DLDPTENPFDLL (717)	1.00
20	LDPTENPFDLLD (718)	1.11
	DPTENPFDLLDF (719)	4.16
	PTENPFDLLDFN (720)	4.58
	TENPFDLLDFNQ (721)	4.84
	ENPFDLLDFNQ (722)	4.00
	NPFDLLDFNQ (723)	3.13
	PFDLLDFNQ (724)	4.95
25	FDLLDFNQ (725)	4.38
	DLLDFNQ (726)	3.08
	LLDFNQ (727)	1.88
	LDFNQ (728)	0.97
	DFNQ (729)	0.94
	FNQ (730)	1.00
	NQ (731)	0.92
30	QTQPERGDNNLT (732)	0.88
	TQPERGDNNLTR (733)	1.05

Ejemplo 5: Cristalización y mapeo de parátipo/epítipo del fragmento V_HH anti-FIX cpto#2

El propósito del presente estudio fue determinar los residuos de parátipo y epítipo del fragmento V_HH designado cpto#2.

Cristalización

Los cristales del polipéptido V_HH cpto#2 mezclado en una relación molar 1:1 con el Factor IXa sin dominio Gla humano inhibido por EGR-CMK (tipo silvestre) (adquirido de Cambridge ProteinWorks Lote# hGDFIXAWTEGR_11) se cultivó mediante el uso de la técnica de difusión de vapor de gota sentada a 18 °C. Una solución proteica de 100 nl 8.4 mg/ml de complejo en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM y CaCl 2.5 mM₂ se mezcló con 100 nl de sulfato de Li 0.2 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, PEG 4000 al 30 % (p/v) como precipitante y se incubó sobre 60 µl de precipitante.

Los cristales aparecieron en el plazo de dos semanas.

Recogida de datos de difracción

El cristal se protegió en frío mediante la adición de 1 µl del precipitante añadido etilenglicol al 20 % a la gota de cristalización antes del enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. Los datos de difracción se recolectaron a 100 K en el haz de luz X06DA de Swiss Light Source (longitud de onda 1.0000 Å) mediante el uso de un detector de píxeles Pilatus 2M de Dectris. La autoindexación, integración y escalado de los datos se realizaron con los programas del paquete XDS (las estadísticas de los datos de difracción se resumen en la tabla 7).

Determinación y refinamiento de la estructura

La unidad asimétrica contiene dos cpto#2:Factor IXa sin dominio Gla inhibido por EGR-CMK, según lo juzgado por el análisis del coeficiente de Matthews. La estructura se determinó por sustitución molecular mediante el uso de Phaser como se implementa en el paquete de programas Phenix mediante el uso de una estructura de un complejo V_HH:FIXa predeterminado como modelo de búsqueda. La secuencia de aminoácidos correcta se construyó mediante el uso de COOT y después la estructura se refinó mediante el uso de las etapas de refinamiento de Phenix y reconstrucción manual en COOT. Las estadísticas del refinamiento se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7: Recogida de datos y estadísticas del refinamiento

	Longitud de onda (Å)	1.0000
	Intervalo de resolución (Å)	43.26-2.7 (2.797 - 2.7)
	Grupo espaciador	P 1
	Celda unitaria (Å, grad)	56.51 64.47 64.72 76.115 87.449 85.761
30	Reflexiones totales	42,366 (4,277)
	Reflexiones únicas	23,473 (2,340)
	Multiplicidad	1.8 (1.8)
	Totalidad (%)	96.66 (96.77)

	Promedio I/sigma(I)	6.44 (1.40)
	Factor B de Wilson (Å ²)	40.75
	Fusión R	0.1042 (0.5247)
	R-meas	0.1473 (0.7416)
	R-pim	0.1041 (0.5241)
	CC1/2	0.986 (0.594)
5	CC*	0.997 (0.863)
	Reflexiones usadas en el refinamiento	23,455 (2,340)
	Reflexiones usadas para la R libre	1176 (115)
	Trabajo R	0.2260 (0.2951)
	R libre	0.2825 (0.3665)
	CC(trabajo)	0.922 (0.745)
	CC(libre)	0.829 (0.421)
10	Cantidad de átomos que no son hidrógeno	6,622
	macromoléculas	6,394
	ligandos	54
	solvente	174
	Residuos de proteínas	823
	RMS(uniones) (Å)	0.004
	RMS(ángulos) (grad)	0.87
	Ramachandran favorecido (%)	94.82
15	Ramachandran permitidos (%)	5.18
	Valores atípicos de Ramachandran (%)	0.00
	Valores atípicos de rotámeros (%)	6.39
	Puntaje	9.91
	Factor B promedio (Å ²)	42.93
	macromoléculas	43.06
	ligandos	42.44
20	Cantidad de grupos TLS	38.49

Las estadísticas para la cubierta de mayor resolución se muestran entre paréntesis.

Determinación del epítipo y el parátipo

El epítipo del cpto#2, definido como residuos de FIX(a) caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4.0 Å de un átomo pesado en el polipéptido V_HH, comprende los siguientes residuos del dominio de proteasa de FIX(a):

25 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257 y N260 de acuerdo con la secuencia de FIX (numeración consecutiva) (SEQ ID NO:1).

El parátipo del cpto#2, definido como los residuos caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4.0 Å a partir de un átomo pesado en FIX(a), comprende los siguientes residuos del cpto#2:

30 F29, N30, Y32, T54, D99, R100, S101, F102, L103, F104, Q106, A107 y N113 (SEQ ID NO:35) (numeración consecutiva).

Ejemplo 6: Cristalización y mapeo de parátipo/epítipo del fragmento V_HH anti-FX cpto#1

El propósito del presente estudio fue determinar los residuos de parátipo y epítipo del fragmento V_HH designado cpto#1.

Cristalización

- 5 Cristales del polipéptido V_HH cpto#1 mezclados en una relación molar 1:14 con un péptido sintético N-term-NPFDLLD-C-term, correspondiente a la secuencia del péptido de activación aa31-37 del FX humano (adquirido de Schafer-N ApS) como se identificó en el ejemplo 4, se cultivaron mediante el uso de la técnica de difusión de vapor de gota sentada a 18 °C. Una solución proteica de 150 nl de complejo 4.0 mg/ml en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM se mezcló con 50 nl de NaCl 0.2 M, sulfato de amonio 2 M, cacodilato de sodio 0.1 M, pH 6.5 como precipitante y se incubó sobre 60 µl de precipitante. Los cristales aparecieron en el plazo de una semana.

Recogida de datos de difracción

- El cristal se protegió en frío mediante la adición de 1 µl del precipitante añadido etilenglicol al 20 % a la gota de cristalización antes del enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. Los datos de difracción se recolectaron a 100 K en el haz de luz X06DA de Swiss Light Source (longitud de onda 1.0000 Å) mediante el uso de un detector de píxeles Pilatus 2M de Dectris. La autoindexación, integración y escalado de los datos se realizaron con los programas del paquete XDS (las estadísticas de los datos de difracción se resumen en la Tabla 8).

Determinación y refinamiento de la estructura

- 20 La unidad asimétrica contiene un complejo cpto#1:péptido. La estructura se determinó por reemplazo molecular mediante el uso de Phaser como se implementa en el paquete de programas Phenix mediante el uso de la estructura del polipéptido V_HH designada con el banco de datos de proteínas ID 4B41 (cadena A) como modelo de búsqueda. Se introdujo la secuencia de aminoácidos correcta del cpto#1 y se identificó la diferencia de densidad de electrones para el péptido sintético y se construyó el modelo manualmente, todo mediante el uso de COOT. Después la estructura se refinó mediante el uso de las etapas de refinamiento de Phenix y reconstrucción manual en COOT. Las estadísticas del refinamiento se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8: Recogida de datos y estadísticas del refinamiento

30	Longitud de onda (Å)	1.0000
	Intervalo de resolución (Å)	47.61-3.183 (3.297-3.183)
	Grupo espaciador	P6 ₁ 22
	Celda unitaria (Å, grad)	83.65 83.65 126.32 90 90 120
	Reflexiones totales	80,989 (3,197)

	Reflexiones únicas	4,667 (353)
	Multiplicidad	17.4 (9.1)
	Totalidad (%)	97.57 (76.08)
	Promedio I/sigma(I)	8.69 (1.55)
	Factor B de Wilson ($\text{\AA}^2$)	50.39
5	Fusión R	0.4146 (1.447)
	R-meas	0.4271 (1.516)
	R-pim	0.1004 (0.4227)
	CC1/2	0.985 (0.651)
	CC*	0.996 (0.888)
	Reflexiones usadas en el refinamiento	4,664 (353)
	Reflexiones usadas para la R libre	234 (18)
	Trabajo R	0.1948 (0.2689)
10	R libre	0.2500 (0.3981)
	CC(trabajo)	0.957 (0.685)
	CC(libre)	0.934 (0.389)
	Cantidad de átomos que no son hidrógeno	986
	macromoléculas	981
	ligandos	5
	solvente	0
	Residuos de proteínas	130
15	RMS(uniones) ($\text{\AA}$)	0.003
	RMS(ángulos) (grad)	0.59
	Ramachandran favorecido (%)	96.83
	Ramachandran permitidos (%)	3.17
	Valores atípicos de Ramachandran (%)	0.00
	Valores atípicos de rotámeros (%)	0.00
	Puntaje	8.68
20	Factor B promedio ($\text{\AA}^2$)	44.41
	macromoléculas	44.18
	ligandos	88.79
	Cantidad de grupos TLS	1

Las estadísticas para la cubierta de mayor resolución se muestran entre paréntesis.

Determinación del epítopo y el parátopo

- 25 El epítopo del péptido sintético, definido como los residuos del péptido de activación de FX caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4.0 $\text{\AA}$ de un átomo pesado en el polipéptido V_HH cpto#1, comprende los siguientes residuos del péptido sintético N173, P174, F175, L177 y L178 de acuerdo con la secuencia del péptido de activación de FX correspondiente basada en la numeración consecutiva (SEQ ID NO:2).
- 30 El parátopo del polipéptido V_HH cpto#1, definido como residuos del cpto#1 caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4.0 $\text{\AA}$ de un átomo pesado en el péptido sintético, comprende los siguientes residuos del cpto#1:

D32, A33, M34, G35, Y37, L47, V48, A49, G50, I51, M52, N57, T58, N59, Y60, T61, K97, V99, R101 y P102 (SEQ ID NO:27) (numeración consecutiva).

Se realizó la construcción de un modelo de homología del polipéptido V_HH cpto#3 en complejo con el péptido sintético, ya que el cpto#3 se usó como la secuencia del polipéptido V_HH parental para optimizaciones racionales basadas en secuencias y estructuras.

La estructura cristalina del cpto#1 en complejo con el péptido sintético del experimento descrito anteriormente se usó como modelo de partida para el modelo de homología del cpto#3 en complejo con el péptido sintético. Las secuencias de aminoácidos del cpto#1 y el cpto#3 se alinearon y los residuos de aminoácidos que diferían entre las dos secuencias se mutaron en COOT para crear un modelo de partida para el cpto#3. Este modelo, que incluye el cpto#3, se procesó previamente, se optimizó y se ejecutó a través de una minimización restringida en MAESTRO de SCHRÖDINGER. El modelo mostró los mismos residuos de epítipo y parátipo como se describió anteriormente, ya que las secuencias fueron idénticas en estas posiciones.

Ejemplo 7: Análisis por SPR de polipéptidos V_HH anti-FX/anti-FIX(a)

El propósito del presente estudio fue estimar las constantes de unión de compuestos de polipéptidos V_HH anti-FX/anti-FIX(a) seleccionados con FX derivado de plasma humano y Benefix[®] mediante análisis por resonancia de plasmones superficiales (SPR).

La unión de los compuestos polipeptídicos V_HH anti-FX/FIX(a) purificados derivados de plasma humano (Haematologic Technologies Inc, EE. UU.) se analizó mediante SPR.

Brevemente, un anti-GLA-FX, preparado recombinantemente como se describió anteriormente, se inmovilizó en un chip sensor CM4 o un Xantec HLC200M mediante el uso de una química de acoplamiento de amina estándar a pH 5. Se inyectó FX 10 nM (Haematologic Technologies, EE. UU.) a un régimen de flujo de 10 µl/min durante 30 segundos. Subsecuentemente, se inyectaron 1,000, 100, 10, 1, 0.1 y 0 nM del compuesto de polipéptido V_HH, de acuerdo con la Tabla 9 más abajo, a un régimen de flujo de 50 µl/min durante 200 segundos para permitir la unión a FX seguido de un flujo de 10 minutos con una inyección de tampón de corrida (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, surfactante P20 al 0.05 % (v/v), albúmina sérica bovina 1 mg/ml, pH 7.4) que permite la disociación de FX. El tampón de corrida también se usó para la dilución de compuestos de polipéptidos V_HH anti-FX. La regeneración del chip se logró mediante el uso de un tampón de regeneración que consiste en EDTA 50 mM en tampón de corrida, tiempo de contacto de 30 segundos y un régimen de flujo de 30 µl/min. Los datos de unión se recolectaron a 25 °C y se

analizaron de acuerdo con un modelo 1:1 mediante el uso de BiaEvaluation 4.1 suministrado por el fabricante (Biacore AB, Uppsala o analizador Bruker).

En todos los casos, los sensogramas de unión mostraron un perfil de cinética de unión de activación rápida y desactivación rápida que impidió la determinación de K_D basada en el análisis cinético. Por lo tanto, los valores de K_D informados se determinan en base al análisis de estado estacionario. El análisis dio como resultado las constantes de unión informadas en la Tabla 9 más abajo.

La unión de los compuestos polipeptídicos V_{HH} anti-FX/FIX(a) purificados a Benefix[®] (Pfizer Inc, EE. UU.) se analizó mediante SPR. Brevemente, anti-GLA-FIX, preparado de forma recombinante como se describió anteriormente, se inmovilizó en un chip sensor CM4 o un Xantec HLC200M mediante el uso de la química de acoplamiento de amina estándar a pH 5. Se inyectó FIX (10 nM) a un régimen de flujo de 10 μ l/min durante 1 minuto. Subsecuentemente se inyectaron 1,000, 100, 10, 1, 0.1 y 0 nM de compuesto polipeptídico V_{HH} a un régimen de flujo de 30 μ l/min durante 4 minutos para permitir la unión al FIX (Benefix[®]) seguido de un flujo de 5 minutos de ejecución de tampón (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂, 0.05 % (v/v) de surfactante P20, 1 mg/ml de albúmina sérica bovina, pH 7.4) mediante inyección que permite la disociación de FIX. El tampón de corrida también se usó para la dilución de los compuestos polipeptídicos V_{HH} anti-FIX. La regeneración del chip se logró mediante el uso de un tampón de regeneración que consiste en EDTA 50 mM en tampón de corrida, tiempo de contacto de 30 segundos y un régimen de flujo de 30 μ l/min. Los datos de unión se recolectaron a 25 °C y se analizaron de acuerdo con un modelo 1:1 mediante el uso de BiaEvaluation 4.1 suministrado por el fabricante (Biacore AB, Uppsala).

En todos los casos, los sensogramas de unión mostraron un perfil de cinética de unión de activación rápida y desactivación rápida que impidió la determinación de K_D basada en el análisis cinético. Por lo tanto, los valores de K_D informados se determinan en base al análisis de estado estacionario.

El análisis de la constante de unión de una serie de compuestos se informa en la Tabla 9. Las afinidades de unión del FIX generalmente estaban en K_D de bajo nM para todos los compuestos, mientras que un intervalo de compuestos mostró K_D de alto nM para la unión de FX. Por lo tanto, se espera que la disposición del fármaco mediada por el objetivo esté ausente para FX, mientras que se esperaría la interacción del FIX, pero limitada a la concentración plasmática en estado estacionario requerida de los compuestos descritos. Por lo tanto, se espera que la concentración plasmática requerida esperada para obtener una cobertura hemostática significativa para los compuestos enumerados sea a una concentración de nM baja dada la alta potencia de los compuestos enumerados.

Tabla 9: Constantes de unión estimadas de compuestos de polipéptidos V_{HH} seleccionados

Constantes de unión estimadas basadas en el análisis de estado estacionario para la interacción de compuestos de polipéptidos V_HH anti-FX/anti-FIX(a) seleccionados con FX derivado de plasma humano y Benefix[®] según se determina mediante análisis por SPR.

ID del compuesto	K _D del aglutinante de FX (nM)	K _D del aglutinante de FIX (nM)
Cpto #4	229	11.7
Cpto #5	199	2.7
Cpto #6	232	4.8
Cpto #7	82	2.3
Cpto #8	96	2.5
Cpto #9	70	1.1
Cpto #10	190	5.5
Cpto #11	42	6.4
Cpto #12	26	7.8
Cpto #13	300	2.0
Cpto #14	42	1.6
Cpto #15	350	3.0

Ejemplo 8: Actividad de polipéptidos V_HH anti-FX/anti-FIX(a) en el ensayo de la prueba de generación de trombina (TGT)

La actividad procoagulante de los derivados polipeptídicos V_HH anti-FX/anti-FIX(a) se determinaron en base a su capacidad para promover la generación de trombina en presencia de membranas de fosfolípidos sintéticos procoagulantes de acuerdo con los principios descritos por Hemker y otros. (Pathophysiol Haemost Thromb, 2002;32:249-253). Se incluyó un análogo de secuencia idéntica de emicizumab (SIA) para la comparación. Cada derivado polipeptídico V_HH se probó en un ensayo de TGT mediante el uso de plasma humano normal pobre en plaquetas (NHP) complementado con anticuerpo policlonal anti-FVIII neutralizante (en adelante denominado HA-PPP).

Las TGT en NHP (de voluntarios sanos) suplementadas con anticuerpo policlonal anti-FVIII humano de oveja (pAb, Haematologic Technologies Inc., VT, EE. UU.) se realizaron mediante trombografía automatizada calibrada estándar mediante el uso de un fluorómetro de placa de 96 pocillos (Fluoroscanner Ascent FL, Thermolabsystems, Helsinki, Finlandia). Las mezclas de reacción contenían 36 µl de NHP preincubado con 0.1 µg/ml de pAb anti-FVIII, 4 µl de dilución del compuesto de prueba (diluido en HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4, BSA al 2 %), 10 µl de factor tisular (TF, pppLow, de Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos) o 1 a 8.3 U/ml de factor XIa humano (Enzyme Research Laboratories, IN, EE. UU.) y 10 µl de FluCa Substrate (Thrombinoscope BV,

Maastricht, Países Bajos). El ensayo de TGT se calibró mediante el uso del calibrador de trombina (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos), donde se mezcló 10 μ l de calibrador de trombina con 36 μ l de NHP preincubado con 0.1 μ g/ml de pAb anti-FVIII, 4 μ l de tampón (HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4, BSA al 2 %). Generalmente, TGT se realizó a 8 concentraciones del compuesto de prueba (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM, concentración plasmática final, o similar) o tampón añadido (HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4, BSA al 2 %) solo (que representa el control). Los niveles de control normales en TGT se midieron mediante el uso solamente de la adición de tampón a NHP (HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4, BSA al 2 %). Se dejó continuar la TGT durante un total de 60 minutos y el parámetro TGT de altura máxima de trombina (nM) se analizó mediante el programa informático Thrombinoscope (Thrombinoscope BV). Ver la Figura 4 para las curvas de titulación representativas para un derivado polipeptídico V_HH de prueba seleccionado, cpto #6, y comparadores de SIA de emicizumab y Mim8. Las evaluaciones de la diferencia del nivel de actividad se realizaron como diferencia en la EC₅₀ con relación a los comparadores, *por ejemplo*, SIA de emicizumab, o como diferencia en la altura máxima del pico de trombina para un compuesto de polipéptido V_HH dado con relación a la altura máxima del pico de trombina para el SIA de emicizumab. Este último enfoque se usó para cribar mayores cantidades de derivados polipeptídicos V_HH.

Para reforzar la actividad de los derivados polipeptídicos V_HH, se identificaron combinaciones óptimas de mutaciones de CDR para generar el máximo efecto de actividad. Se usaron modelos de estructura cristalina tales como los descritos en los ejemplos 5 y 6 para identificar residuos de parátomos importantes así como también para identificar residuos expuestos en la superficie adecuados para sustituirse con cisteína, como sitios de conjugación, y sustituciones reductoras del pI para mejorar la biodisponibilidad. También se investigaron diferentes enlazadores y diferentes tipos de conjugación. En las siguientes tablas, se describen los perfiles de actividad de una serie de derivados polipeptídicos V_HH que abordan cada uno de estos parámetros se describen individualmente y se describirán.

En la tabla 10, se muestran valores de EC₅₀ de potencia obtenidos de derivados polipeptídicos V_HH optimizados que se optimizaron para mutaciones de potenciación de la actividad. Se usaron algoritmos de componentes principales computacionales y de bosque aleatorio para combinaciones mutacionales para aumentar las actividades. El polipéptido V_HH cpto #24 fue el derivado inicial sin mutaciones de refuerzo y en comparación con este derivado polipeptídico V_HH y con SIA de

emicizumab, se obtuvo un aumento de hasta 40 veces y hasta 76 veces mejores potencias, respectivamente, entre los mejores derivados polipeptídicos V_HH desarrollados.

Tabla 10: Actividad de TGT de derivados polipeptídicos V_HH, optimización de la actividad

ID del compuesto	Resto de prolongación P y L _P (núm. de restos de prolongación)	pI	Potencia EC ₅₀ de actividad TGT (nM)
SIA de emicizumab	-	-	113.9
Mim8	-	-	7.8
Cpto #4	P3 y L _P 1 (1)	8.36	4.1
Cpto #6	P2 y L _P 1 (2)	6.56	4.4
Cpto #7	P2 y L _P 1 (2)	5.38	2.4
Cpto #8	P2 y L _P 1 (2)	5.05	2.3
Cpto #9	P2 y L _P 1 (2)	4.97	2.1
Cpto #10	P2 y L _P 1 (2)	5.69	2.7
Cpto #11	P2 y L _P 1 (2)	5.08	2.0
Cpto #12	P2 y L _P 1 (2)	4.89	2.2
Cpto #13	P2 y L _P 1 (2)	4.89	2.7
Cpto #14	P2 y L _P 1 (2)	5.20	2.2
Cpto #15	P2 y L _P 1 (2)	5.20	2.5
Cpto #16	P2 y L _P 1 (2)	5.08	4.5
Cpto #17	P2 y L _P 1 (2)	4.80	4.2
Cpto #18	P2 y L _P 1 (2)	4.97	4.6
Cpto #19	P2 y L _P 1 (2)	5.05	3.8
Cpto #20	P2 y L _P 1 (2)	5.38	3.6
Cpto #21	P2 y L _P 1 (2)	4.80	2.5
Cpto #22	P2 y L _P 1 (2)	5.08	2.6
Cpto #24	P3 y L _P 1 (1)	7.31	87.0
Cpto #69	Ninguno	8.36	1.5

En la tabla 11, se realizó el cribado de sitios de conjugación óptimos en polipéptidos V_HH (fuera de CDR1-3) que conservaron la actividad de los polipéptidos V_HH después de la sustitución con cisteína (con y sin conjugación con un resto de prolongación de ácidos grasos diácido C18 P3 unido a través de un enlazador L_P1).

Se probó un total de 95 sitios expuestos en la superficie con la introducción de la sustitución por Cys. En base a la numeración consecutiva mediante el uso del cpto #23/24 como referencia (que representa polipeptidos V_HH sin ninguna mutación de potenciación en CDR), se llevó a cabo un cribado para determinar el sitio óptimo de conjugación. Se probaron las siguientes sustituciones de residuos: G27C, V28C, V29C, Q30C, P31C, G32C, S34C, L35C, R36C, S38C, A40C, S42C, R55C, Q56C, A57C, P58C, G59C, K60C, E61C, R62C, Y77C, A78C, D79C, V81C, K82C, G83C, R84C,

F85C, T86C, S88C, D90C, N91C, S92C, K93C, T95C, Y97C, Q99C, M100C, N101C, S102C, L103C, R104C, P105C, E106C, D107C, T108C, G156C, V157C, V158C, Q159C, P160C, G161C, G162C, S163C, L164C, R165C, S167C, A169C, S171C, R184C, Q185C, A186C, P187C, G188C, K189C, E190C, R191C, Y206C, A207C, D208C, S209C, V210C, K211C, G212C, R213C, F214C, T215C, S217C, D219C, N220C, S221C, K222C, T224C, Y226C, Q228C, M229C, N230C, S231C, L232C, R233C, P234C, E235C, D236C, T237C y Cys introducida en una extensión C-terminal.

De estos, los siguientes 41 polipéptidos V_HH podrían expresarse mediante el uso de un sistema de expresión HEK293 y conjugarse con éxito con el reactivo C3 que comprende un resto prolongador diácido C18: Q30C, P31C, Q56C, A57C, K60C, E61C, A78C, D79C, K82C, N91C, S92C, Q99C, R104C, G156C, V158C, Q159C, P160C, G161C, G162C, S163C, A169C, S171C, Q185C, A186C, P187C, G188C, K189C, E190C, A207C, D208C, S209C, V210C, T215C, S217C, D219C, N220C, S221C, K222C, S231C, R233C y Cys introducida en una extensión C-terminal. Estos 41 polipéptidos V_HH con y sin conjugaciones se analizaron para determinar la actividad en un ensayo de TGT. Los niveles de actividad relativa, expresados como la altura máxima del pico de trombina del derivado polipeptídico V_HH con relación a la altura máxima del pico de trombina de SIA de emicizumab, de los polipéptidos V_HH (derivados) con y sin conjugaciones se exponen en la tabla 11. Por tanto, los siguientes 9 sitios se identificaron como óptimos para la introducción de una Cys libre para la conjugación con un resto de prolongación, por ejemplo, mediante el uso de C3 como reactivo, basado en las actividades conservadas antes y después de la conjugación: Cys introducida en una extensión C-terminal (Cpto #23/24), Q30C (Cpto #25/26), V158C (Cpto #27/28), P160C (Cpto #29/30), G161C (Cpto #31/32), G188C (Cpto #33/34), E190C (Cpto #35/36), S209C (Cpto #37/38) y S231C (Cpto #39/40).

Tabla 11: Actividad de TGT de derivados polipeptídicos V_HH, cribado del sitio de conjugación del resto de prolongación

Derivados polipeptídicos V _H H (variantes de cpto#23/24 sin extensión C-term) sitios de conjugación de Cys (numeración consecutiva)	Actividad de TGT, relación pico máx. (con relación al SIA de emicizumab)
SIA de emicizumab, control de referencia	1.0
Polipéptido V _H H_1, Cys en la extensión de enlazador C-term SGGGSGGGSCHHHHHH (SEQ ID NO:23)	1.4
Polipéptido V _H H_1 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.3
Polipéptido V _H H_2, sustitución de Cys Q30C	1.8

5	Polipéptido V _H H_2 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.5
	Polipéptido V _H H_3, sustitución de Cys P31C	1.9
	Polipéptido V _H H_3 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.0
	Polipéptido V _H H_4, sustitución de Cys E58C	1.9
	Polipéptido V _H H_4 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.5
10	Polipéptido V _H H_5, sustitución de Cys A78C	2.1
	Polipéptido V _H H_5 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.3
	Polipéptido V _H H_6, sustitución de Cys K82C	1.7
	Polipéptido V _H H_6 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.4
	Polipéptido V _H H_7, sustitución de Cys N91C	2.3
15	Polipéptido V _H H_7 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.9
	Polipéptido V _H H_8, sustitución de Cys S92C	2.3
	Polipéptido V _H H_8 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.7
	Polipéptido V _H H_9, sustitución de Cys Q99C	2.1
	Polipéptido V _H H_9 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.2
20	Polipéptido V _H H_10, sustitución de Cys R104C	1.7
	Polipéptido V _H H_10 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.6
	Polipéptido V _H H_11, sustitución de Cys G156C	0.1
	Polipéptido V _H H_11 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.2
	Polipéptido V _H H_12, sustitución de Cys V158C	1.6
25	Polipéptido V _H H_12 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.4
	Polipéptido V _H H_13, sustitución de Cys Q159C	1.9
	Polipéptido V _H H_13 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.4
	Polipéptido V _H H_14, sustitución de Cys P160C	2.0
	Polipéptido V _H H_14 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.9
30	Polipéptido V _H H_15, sustitución de Cys G161C	1.8
	Polipéptido V _H H_15 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.6
	Polipéptido V _H H_16, sustitución de Cys G162C	1.9
	Polipéptido V _H H_16 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.3
	Polipéptido V _H H_17, sustitución de Cys S163C	1.8

5	Polipéptido V _H H_17 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.4
	Polipéptido V _H H_18, sustitución de Cys A169C	2.0
	Polipéptido V _H V _H H_18 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.0
	Polipéptido V _H H_19, sustitución de Cys S171C	2.1
	Polipéptido V _H H_19 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.8
10	Polipéptido V _H H_20, sustitución de Cys Q185C	1.1
	Polipéptido V _H H_20 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.3
	Polipéptido V _H H_21, sustitución de Cys A186C	1.0
	Polipéptido V _H H_21 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.4
	Polipéptido V _H H_22, sustitución de Cys P187C	2.2
15	Polipéptido V _H H_22 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.6
	Polipéptido V _H H_23, sustitución de Cys G188C	2.0
	Polipéptido V _H H_23 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.8
	Polipéptido V _H H_24, sustitución de Cys K189C	1.7
	Polipéptido V _H H_24 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.4
20	Polipéptido V _H H_25, sustitución de Cys E190C	1.8
	Polipéptido V _H H_25 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.5
	Polipéptido V _H H_26, sustitución de Cys A207C	1.9
	Polipéptido V _H H_26 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.4
	Polipéptido V _H H_27, sustitución de Cys D208C	2.3
25	Polipéptido V _H H_27 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.5
	Polipéptido V _H H_28, sustitución de Cys S209C	1.9
	Polipéptido V _H H_28 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.7
	Polipéptido V _H H_29, sustitución de Cys V210C	1.9
	Polipéptido V _H H_29 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.5
30	Polipéptido V _H H_30, sustitución de Cys T215C	1.9
	Polipéptido V _H H_30 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.2
	Polipéptido V _H H_31, sustitución de Cys S217C	1.8
	Polipéptido V _H H_31 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.2
	Polipéptido V _H H_32, sustitución de Cys D219C	1.8

5	Polipéptido V _H H_32 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.0
	Polipéptido V _H H_33, sustitución de Cys N220C	2.1
	Polipéptido V _H H_33 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.8
	Polipéptido V _H H_34, sustitución de Cys S221C	1.9
	Polipéptido V _H H_34 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.7
10	Polipéptido V _H H_35, sustitución de Cys K222C	1.9
	Polipéptido V _H H_35 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.1
	Polipéptido V _H H_36, sustitución de Cys S231C	1.9
	Polipéptido V _H H_36 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.9
	Polipéptido V _H H_37, sustitución de Cys R233C	1.9
15	Polipéptido V _H H_37 con conjugación de ácido graso diácido C18	1.4
	Polipéptido V _H H_38, sustitución de Cys Q56C	1.1
	Polipéptido V _H H_38 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.3
	Polipéptido V _H H_39, sustitución de Cys A57C	0.9
	Polipéptido V _H H_39 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.4
20	Polipéptido V _H H_40, sustitución de Cys K60C	1.7
	Polipéptido V _H H_40 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.4
	Polipéptido V _H H_41, sustitución de Cys D79C	1.7
	Polipéptido V _H H_41 con conjugación de ácido graso diácido C18	0.7

La prueba de diferentes enlazadores L₁₋₂ fusionados recombinantemente entre los dos fragmentos V_HH anti-FIX y anti-FX se realizó a H para optimizar la composición (ver tabla 12). Los niveles de actividad relativa, expresados como la altura máxima del pico de trombina del polipéptido V_HH con relación a la altura máxima del pico de trombina de SIA de emicizumab, de los polipéptidos V_HH se exponen en la tabla 12. A partir de estos datos, los polipéptidos V_HH con enlazadores de composición hidrófoba generalmente mostraron las actividades relativas más altas, mientras que los polipéptidos V_HH con enlazadores de composición ácida o hidrófila mostraron las actividades más bajas. Los polipéptidos V_HH con enlazadores de composición mixta compuesta de QAPGQA, GQAPGQ o similares mostraron actividades relativas intermedias. La composición óptima del enlazador contendría preferentemente aminoácidos tanto hidrófilos como hidrófobos, por tanto, el enlazador QAPGQA, por ejemplo, se investigó adicionalmente para determinar la estabilidad química

mediante el uso del análisis por MS que muestra una alta estabilidad bajo condiciones de estrés acelerado a 37 °C durante dos semanas en un tampón isotónico y pH neutro.

Por tanto, se prefiere una relación de aminoácidos hidrófobos a hidrófilos de “40 a 60 %” a “60 a 40 %”. Todos los polipéptidos V_HH indicados incluyeron el mismo conjunto de mutaciones de CDR que potencian la actividad, pero un conjunto diferente de mutaciones reductoras del pI fuera de las CDR.

Tabla 12: Actividad de TGT de secuencias de polipéptidos V_HH con diferentes características de enlazadores L₁₋₂

ID del polipéptido V _H H	Secuencia del enlazador (L ₁₋₂)	Actividad de TGT, relación pico máx. (con relación al SIA de emicizumab)
SIA de emicizumab		1.0
Cpto #41	QAPGQA	5.2
Cpto #42	GIGIGIGIGI	5.5
Cpto #43	GTGTGTGTGT	3.7
Cpto #44	GVGVGVGVGV	5.7
Cpto #45	GQAPGQ	4.9
Cpto #46	GGGSGGGS	5.0
Cpto #47	QAPGQA	5.4
Cpto #48	GLGLGLGLGL	7.0
Cpto #49	GTGTGTGTGT	4.4
Cpto #50	GVGVGVGVGV	5.6
Cpto #51	GGGSGGGS	4.1
Cpto #52	QAPGQA	4.9
Cpto #53	GEGEGEGE	3.1
Cpto #54	GLGLGLGLGL	5.6
Cpto #55	GTGTGTGTGT	4.9
Cpto #56	GVGVGVGVGV	5.6
Cpto #57	GQAPGQ	6.9

Ejemplo 9: Formulación de derivados polipeptídicos V_HH anti-FX/anti-FIX(a) con SNAC y NAM en una forma de dosificación adecuada para la administración peroral

Para prepararse para los estudios orales que usan formulaciones líquidas con N-(8-[2-hidroxibenzoil] amino) caprilato de sodio (SNAC) y nicotinamida (NAM) como excipientes, se siguió el siguiente procedimiento. Se pesó el SNAC para obtener una concentración de 200 mg/ml, el NAM se pesó para obtener una concentración de 1 M, el tampón HEPES se pesó para obtener una concentración final de 5 mM. Los polvos se transfirieron a un vial de vidrio y se añadió en consecuencia MilliQ-H₂O. La solución se agitó con un agitador magnético hasta que se disolvieron el SNAC, NAM y el estearato de magnesio. Se midió el pH y se ajustó a pH 8 con NaOH 2 M. Por tanto, lotes de derivados

polipeptídicos V_HH purificados y conjugados de 2-5 mg/ml se formularon en líquido con una concentración final de SNAC 200 mg/ml y NAM 1 M.

Para prepararse para estudios orales mediante el uso de comprimidos de SNAC y NAM, se siguió el siguiente procedimiento. Lotes de polipéptidos V_HH purificados (derivados) con o sin conjugaciones

- 5 de prolongadores de ácidos grasos se intercambiaron en tampón en MilliQ-H₂O y pH ajustado a 8.0 mediante el uso de NaOH 0.1 M o ácido fórmico 0.1 M. Los polipéptidos V_HH (derivados) disueltos en MilliQ-H₂O estaban a concentraciones de 0.5 a 4 mg/ml. Se realizó el secado por atomización de polipéptidos V_HH (derivados) mediante el uso del Mini Spray Dryer B290 (BUCHI) con configuración de bomba 5-6, flujo de alimentación: 2 ml/min, temperatura de entrada: 80-85 °C, 10 temperatura de salida: 45-50 °C, boquilla: 1.5 mm y aspiración: 100 %.

Para preparar los comprimidos, se mezcló el polvo para obtener las composiciones deseadas. Se prepararon las siguientes formulaciones de comprimidos.

Formulación #1

- | | | |
|----|--|----------|
| | Polipéptido V _H H (derivado): | 10-20 mg |
| 15 | SNAC: | 300 mg |
| | NAM: | 0 mg |
| | Estearato de magnesio: | 5.5 mg |

Formulación #2

- | | | |
|----|--|----------|
| | Derivado polipeptídico V _H H: | 10-20 mg |
| 20 | SNAC: | 300 mg |
| | NAM: | 200 mg |
| | estearato de magnesio: | 5.5 mg |

Formulación #3

- | | | |
|----|--|---------|
| | Derivado polipeptídico V _H H: | 20 mg |
| 25 | SNAC: | 150 mg |
| | NAM: | 100 mg |
| | estearato de magnesio: | 1.25 mg |

Los polvos mezclados se pesaron y golpearon para obtener un comprimido homogéneo mediante el uso de Kilian Style One (Romaco) con ajuste de golpeo para simular una prensa giratoria.

- 30 Ejemplo 10: Estudio farmacocinético por vía peroral e intravenoso en ratas mediante el uso de derivados polipeptídicos V_HH anti-FX/anti-FIX(a) con diferentes mutaciones que cambian el pI

El propósito del presente estudio fue investigar el efecto de las mutaciones que cambian el pI en derivados polipeptídicos V_HH anti-FX/FIX(a) en parámetros farmacocinéticos tales como biodisponibilidad oral.

Formulaciones líquidas de derivados polipeptídicos V_HH anti-FX/FIX(a) se administraron por vía intravenosa (IV) (formulación IV: Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) o se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 9 y se administraron por sonda gástrica a grupos paralelos de ratas Sprague Dawley aclimatadas al menos una semana en casa antes del estudio y se mantuvieron en jaulas grupales con acceso ad libitum a alimentos y agua estándar. Las ratas para la administración oral se sometieron a ayuno, con acceso libre al agua, en jaulas con fondo de rejilla desde aproximadamente las 2 p.m. del día anterior a la administración de la dosis (por un total de 18 horas). El día de la administración de la dosis, todas las ratas se aclimataron en la sala de procedimientos durante 30 minutos.

Se recolectaron muestras de sangre inmediatamente antes de la administración de la dosis y subsecuentemente en varios puntos temporales diferentes posteriores a la dosis. Los animales administrados por vía oral (PO) se mantuvieron en ayunas en jaulas de fondo de rejilla hasta 4 horas después de la administración. Las concentraciones plasmáticas de los derivados polipeptídicos V_HH se midieron mediante el uso de un inmunoensayo basado en gamma-Glu, en el que se usó un anticuerpo anti-V_HH (Novo Nordisk, Dinamarca) y un anti-gamma-Glu (Novo Nordisk, Dinamarca) hacia el resto de prolongación de la molécula de prueba. Aquí, las placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, 439454) se recubrieron con 2 µg/ml de anticuerpo anti-gamma-Glu, se lavaron y se bloquearon mediante el uso de PBS; tween20 al 0.05 %; BSA al 1 %; pH 7.4. Después de una etapa de lavado, el calibrador específico del compuesto (0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2,000 pM) en muestras de plasma con EDTA al 1 % de rata y muestras de plasma con EDTA de rata en una dilución mínima de 100x se incubaron en la placa, donde el derivado polipeptídico V_HH se capturó a través del resto de prolongación gamma-Glu. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió un anticuerpo específico de V_HH interno biotinilado a la placa (0.5 nM) para preparar el ELISA tipo sándwich. Después de una etapa de lavado final, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a la placa como el reactivo de detección. La cantidad de anticuerpo marcado con biotina unido al derivado polipeptídico V_HH se detectó después de la adición de un sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La densidad óptica se midió mediante el uso de un espectrómetro (por ejemplo, un espectrómetro SpectraMax[®] M2 (Molecular Devices)). La respuesta fue proporcional a la concentración de peroxidasa, que de nuevo fue proporcional a la concentración del derivado polipeptídico V_HH. Basado en estos datos de

exposición, los parámetros farmacocinéticos no compartimentales se calcularon mediante el uso del programa informático de análisis estadístico de código abierto R (paquete ‘NonCompart’).

Las siguientes sustituciones reductoras del pI T28D, K43Q, K65Q, N84D, R148Q, N159D, K172Q, K194Q y N213D (basadas en la numeración consecutiva mediante el uso del cpto#4 como plantilla)

5 introducidas en los residuos expuestos en la superficie fuera de las CDR, se probaron en diferentes combinaciones (que conducen a derivados polipeptídicos V_HH cpto#59 a 64 y cpto#5) y se compararon con el derivado polipeptídico V_HH cpto#4 sin ajuste del pI.

Los resultados se proporcionan en las tablas 13 y 14 más abajo para los derivados V_HH y muestran un efecto de reducción del pI en la biodisponibilidad por vía peroral.

10 La disminución del pI de aproximadamente 8.36 a 5.85 aumentó la biodisponibilidad de 5 a 10 veces (ver tabla 13). No se observó efecto de la disminución del pI sobre la semivida (ver tabla 14).

15

20

25

30

Tabla 13: Datos de biodisponibilidad oral de derivados polipeptídicos V_{HH} con mutaciones del pI manipuladas por ingeniería genética en el modelo de rata PO

ID de derivados	Prolongador, sitio de conjugación	pI	N (Grupo PO)	Dosis PO (nmol/kg)	Biodisponibilidad PO (%)
Cpto #4	Diácido C18, conjugación Cys C-term	8.36	6	338	0.02
Cpto #59	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.57	7	214-230	0.04
Cpto #5	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.56	7	215-233	0.07
Cpto #60	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.42	7	166-167	0.14
Cpto #61	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.42	7	166-167	0.10
Cpto #62	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.09	7	190-208	0.19
Cpto #63	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.09	7	166-167	0.15
Cpto #64	Diácido C18, conjugación Cys C-term	5.85	6	338	0.12

Tabla 14: Datos PK de derivados polipeptídicos V_{HH} con mutaciones del pI manipuladas por ingeniería genética probadas en un modelo de rata IV

ID de derivados	Prolongador, sitio de conjugación	pI	N (Grupo i.v.)	Dosis i.v. (nmol/kg)	MRTHL* i.v. (Días)
Cpto #4	Diácido C18, conjugación Cys C-term	8.36	3	6.7	0.51
Cpto #59	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.57	3	6.6	0.51

5

10

15

20

25

30

Cpto #5	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.56	3	6.6	0.53
Cpto #60	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.42	3	6.6	0.57
Cpto #61	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.42	3	6.6	0.57
Cpto #62	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.09	3	6.6	0.72
Cpto #63	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.09	3	6.6	0.43
Cpto #64	Diácido C18, conjugación Cys C-term	5.85	3	6.7	0.48

* MRTHL: Vida media terminal tiempo medio de residencia. MRTHL se calcula como $MRT \cdot \ln(2)$.

Ejemplo 11: Estudio farmacocinético intravenoso en ratas: polipéptido V_HH anti-FX/anti-FIX(a) (derivados) con diferentes prolongadores

El propósito del presente estudio fue investigar el efecto de diferentes prolongadores en parámetros farmacocinéticos tales como la vida media en derivados polipeptídicos V_HH.

- 5 Formulaciones líquidas de derivados polipeptídicos V_HH anti-FX/FIX(a) preparados de acuerdo con el Ejemplo 9 se administraron por vía intravenosa (IV) a grupos paralelos de ratas Sprague Dawley; se aclimataron al menos una semana en casa antes del estudio y se mantuvieron en jaulas grupales con acceso ad libitum a alimentos y agua estándar. Las ratas para la administración oral se sometieron a ayuno, con acceso libre al agua, en jaulas con fondo de rejilla desde aprox. las 2 p.m. del día
- 10 anterior a la administración (por un total de 18 horas). El día de la administración de la dosis, todas las ratas se aclimataron en la sala de procedimientos durante 30 minutos. Se recolectaron muestras de sangre inmediatamente antes de la administración de la dosis y subsecuentemente en varios puntos temporales diferentes posteriores a la dosis. Las concentraciones plasmáticas de los polipéptidos V_HH (derivados) se midieron mediante el uso de un inmunoensayo basado en etiqueta His o gamma-
- 15 Glu, en el que se usaron un anticuerpo anti-V_HH (Novo Nordisk) hacia el derivado polipeptídico V_HH junto con un anticuerpo anti-etiqueta His (R&D systems, MAB050) hacia la etiqueta His fusionado a la molécula de prueba o un anti-gamma-Glu (Novo Nordisk, Dinamarca) hacia el resto de prolongación de la molécula de prueba. Los dos montajes de inmunoensayo dieron sensibilidades similares, y el último se usó cuando el compuesto polipeptídico V_HH no tenía etiqueta His fusionada
- 20 a la molécula. Las placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, 439454) se recubrieron con la etiqueta His o el anticuerpo anti-gamma-Glu, se lavaron y se bloquearon mediante el uso de PBS; tween20 al 0.05 %; BSA al 1 %; pH 7.4. Después de una etapa de lavado, el calibrador específico derivado (0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2,000 pM) en muestras de plasma con EDTA al 1 % de rata y plasma con EDTA de rata en una dilución mínima de 100x se incubaron en la placa, donde el derivado
- 25 polipeptídico V_HH se capturó a través de su etiqueta His o el resto de prolongación gamma-Glu. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió un anticuerpo específico de V_HH interno biotinilado a la placa (0.5 nM) para preparar el ELISA tipo sándwich. Después de una etapa de lavado final, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a la placa como el reactivo de detección. La cantidad de anticuerpo marcado con biotina unido al derivado polipeptídico V_HH
- 30 se detectó después de la adición de un sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). Las lecturas de densidad óptica se midieron mediante el uso de un espectrómetro (por ejemplo, un espectrómetro SpectraMax® M2 (Molecular Devices)). La respuesta

fue proporcional a la concentración de peroxidasa, que nuevamente fue proporcional a la concentración del derivado polipeptídico V_HH. En base a estos datos de exposición, los parámetros farmacocinéticos no compartimentales se calcularon mediante el uso de Phoenix WinNonlin o el programa informático de análisis estadístico de código abierto R (paquete ‘NonCompart’).

- 5 Los resultados de derivados polipeptídicos V_HH con diferentes tipos de prolongadores se muestran en la tabla 15 más abajo. Los resultados muestran el efecto de usar diferentes ácidos grasos y péptidos de unión a la albúmina como prolongadores en la vida media terminal tiempo medio de residencia (MRTHL).

- 10 Se observó un aumento de la semivida en comparación con los polipéptidos no prolongados para los derivados polipeptídicos V_HH que tienen conjugaciones de cadena lateral de ácido graso C18, C20 y tetrazol (cpto#6, cpto#67 y cpto#68: aumento de 3 a 4 veces), así como también para los derivados polipeptídicos V_HH con fusiones de prolongadores de péptidos de unión a albúmina (cpto#70, cpto#71, cpto#72 y cpto#73: aumento de 1.9 a 3.6 veces) con un efecto óptimo de usar un enlazador L_p GlySer de 30 residuos de largo fusionado C-terminalmente entre el péptido de unión a albúmina
- 15 y el polipéptido V_HH. El derivado polipeptídico V_HH, cpto #65, con un ácido graso C12 corto mostró la vida media más baja. Esto indica que para obtener una prolongación óptima de los derivados polipeptídicos V_HH, para una circulación de semivida prolongada, es preferible un ácido graso más largo que C12 (tal como, por ejemplo, C16, C18 o C20).

20

25

30

Tabla 15: Datos PK de polipeptidos V_HH con diferentes prolongadores probados en modelo de rata IV

ID de derivados	Prolongador y sitio de conjugación	pI	N (Grupo i.v.)	Dosis i.v. (nmol/kg)	MRTHL* i.v. (Días)
Cpto #64	Sin prolongador	7.11	5	6.5	0.19
Cpto #65	Diácido C12, conjugación Cys C-term	7.74	5	6.6	0.11
Cpto #66	Diácido C18, conjugación Cys C-term	7.74	5	6.6	0.63
Cpto #67	Diácido C20, conjugación Cys C-term	7.74	5	6.6	0.75
Cpto #68	Diácido tetrazol, conjugación Cys C-term	7.74	5	6.6	0.71
Cpto #69	Sin prolongador	8.36	3	6.9	0.13
Cpto #4	Diácido C18, conjugación Cys C-term	8.36	3	6.7	0.51
Cpto #70	Péptido de unión a la albúmina, enlazador 10-GlySer, fusión N-term	7.11	2	6.7	0.36
Cpto #71	Péptido de unión a la albúmina, enlazador 30-GlySer, fusión N-term	7.11	2	6.7	0.34
Cpto #72	Péptido de unión a la albúmina, enlazador 10-GlySer, fusión C-term	7.18	2	6.7	0.36
Cpto #73	Péptido de unión a la albúmina, enlazador 30-GlySer, fusión C-term	7.18	2	6.7	0.70

* MRTHL: Vida media terminal tiempo medio de residencia. MRTHL se calcula como $MRT \cdot \ln(2)$.

Ejemplo 12: Estudio farmacocinético peroral e intravenoso en perros: polipéptido V_HH anti-FX/anti-FIX(a) (derivados) formulado con SNAC y NAM

El propósito del presente estudio fue investigar el efecto de la prolongación de ácidos grasos sobre la semivida, y si la disminución del pI conduce a una mayor biodisponibilidad oral.

- 5 Formulaciones apropiadas de polipéptidos V_HH anti-FX/FIX(a) (derivados) se administraron por vía intravenosa o se prepararon como comprimidos y se administraron por vía peroral, respectivamente, a grupos de perros Beagle. Los perros se administraron con la dosis por la mañana después de ayunar durante la noche y se mantuvieron en ayunos durante 3-5 horas después de una única dosis. En un subconjunto^s de estudios orales, los perros recibieron una dosis s.c. de aproximadamente 3 nmol/kg
- 10 de glucagón 10 min antes de la administración oral. Se recolectaron muestras de sangre inmediatamente antes de la administración de la dosis y subsecuentemente en varios puntos temporales diferentes posteriores a la dosis. Las concentraciones plasmáticas de los polipéptidos V_HH se midieron mediante el uso de un inmunoensayo basado en etiquetado His o en un enlazador gamma-Glu, en el que se usaron un anticuerpo anti-V_HH (Novo Nordisk, Dinamarca) hacia el
- 15 polipéptido V_HH junto con un anticuerpo anti-etiqueta His (R&D systems, MAB050) hacia la etiqueta His fusionado a la molécula de prueba o un anti-gamma-Glu (Novo Nordisk, Dinamarca) hacia el resto de prolongación de la molécula de prueba. Las dos configuraciones de inmunoensayo dieron sensibilidades similares, y el último se usó cuando el compuesto del polipéptido V_HH no tenía la etiqueta His fusionada con la molécula. Las placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, 439454) se
- 20 recubrieron con el anticuerpo, se lavaron y bloquearon mediante el uso de PBS; tween20 al 0,05 %; BSA al 1 %; pH 7.4. Después de una etapa de lavado, el calibrador específico del compuesto (0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2,000 pM) en muestras de plasma de EDTA al 1 % de perro y plasma de EDTA de perro en una dilución mínima de 100x se incubaron en la placa, donde el compuesto polipeptídico V_HH se capturó a través de su etiqueta His o el motivo de enlace gamma-Glu. Después
- 25 de una etapa de lavado adicional, se añadió un anticuerpo específico de V_HH interno biotinilado a la placa (0.5 nM) para preparar el ELISA tipo sándwich. Después de una etapa de lavado final, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a la placa como el reactivo de detección. La cantidad de anticuerpo marcado con biotina unido al compuesto polipeptídico V_HH se detectó después de la adición de un sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina).
- 30 Las lecturas de densidad óptica se midieron mediante el uso de un espectrómetro (por ejemplo, un SpectraMax[®] Espectrómetro M2 (Molecular Devices)). La respuesta fue proporcional a la concentración de peroxidasa, que nuevamente fue proporcional a la concentración del compuesto

polipeptídico V_{HH}. En base a estos datos de exposición, los parámetros farmacocinéticos no compartimentales se calcularon mediante el uso de Phoenix WinNonlin o el programa informático de análisis estadístico de código abierto R (paquete ‘NonCompart’).

[§] indica una dosis s.c. de aproximadamente 3 nmol/kg de glucagón 10 min antes de la dosis oral.

- 5 Los resultados se proporcionan en las tablas 16 y 17 más abajo para tres derivados polipeptídicos V_{HH} conjugados con diácidos C18 y confirman

a) un efecto de la prolongación con ácidos grasos sobre la vida media, y

b) que la reducción del pI conduce a una mayor biodisponibilidad oral.

- 10 Por lo tanto, las semividas observadas en perros aumentaron de 370 a 710 veces cuando los derivados polipeptídicos V_{HH} se conjugaron con el ácido graso indicado en comparación con un compuesto no prolongado. El compuesto cpto#6 con dos conjugaciones de ácidos grasos diácido C16 en un enlazador C-terminal mostró el mayor aumento en la vida media de aproximadamente 7.6 días.

- 15 En perros, la formulación SNAC:NAM aumentó la biodisponibilidad oral de 2 a 8 veces en comparación con la formulación SNAC sola. Por tanto, la adición de NAM a la formulación oral tuvo un efecto pronunciado que permitió la biodisponibilidad oral hasta y por encima de un nivel que es clínicamente relevante, es decir, aproximadamente 0.1 %.

- 20 En general, al considerar la potencia, el tiempo medio de residencia y la biodisponibilidad oral, se esperaría que los derivados polipeptídicos V_{HH} como se describe en la presente descripción fueran útiles en el tratamiento de la hemofilia A con o sin inhibidores y la hemofilia A adquirida, cuando se administran por vía peroral.

25

30

Tabla 16: Datos de biodisponibilidad oral del polipéptido V_{HH} (derivados) con mutaciones del pI manipuladas por ingeniería genética y conjugaciones de cadena lateral de ácidos grasos probadas en modelo de perro

ID de derivados	Prolongador, sitio de conjugación	pI	N (Grupo PO)	Formulación PO	Dosis PO (nmol/kg)	Biodisponibilidad PO (%)
Cpto #4	Diácido C18, conjugación Cys C-term	8.36	7	“Formulación #1”	83-216	0.02
Cpto #74 [§]	Sin prolongador	7.74	6	“Formulación #1”	86	0.05
Cpto #61	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.09	7	“Formulación #2”	114-225	0.16
Cpto #63	Diácido C18, conjugación Cys C-term	5.85	7	“Formulación #2”	132-249	0.13
Cpto #6 [§]	Diácido C16 x2, conjugación Cys C-term	5.61	5	“Formulación #2”	99-152	0.09
Cpto #15 [§]	Diácido C16 x2, conjugación Cys C-term	4.89	6	“Formulación #3”	54-71	0.24

Tabla 17: Datos PK de polipéptidos V_{HH} con mutaciones del pI manipuladas por ingeniería genética y conjugaciones de cadena lateral de ácidos grasos probadas en modelo de perro IV

ID de derivados	Prolongador, sitio de conjugación	pI	N (Grupo i.v.)	Dosis i.v. (nmol/kg)	MRTHL i.v.* (Días)
Cpto #4	Diácido C18, conjugación Cys C-term	8.36	2	6.5-6.9	3.7
Cpto #74	Sin prolongador	7.74	3	1.9-2.0	< 0.01
Cpto #61	Diácido C18, conjugación Cys C-term	6.09	2	6.5-6.6	4.5
Cpto #63	Diácido C18, conjugación Cys C-term	5.85	2	6.6-6.7	4.5
Cpto #6	Diácido C16m x2, conjugación Cys C-term	5.61	3	1.7-2.3	7.1
Cpto #15	Diácido C16 x2, conjugación Cys C-term	4.89	2	2.6	4.1

* MRTHL: Vida media terminal tiempo medio de residencia. MRTHL se calcula como $MRT \cdot \ln(2)$.

Ejemplo 13: Estudio farmacocinético intravenoso en cerdos: Polipéptido V_HH anti-FX/anti-FIX(a) conjugado con C18 (derivados)

El propósito del presente estudio fue investigar el efecto farmacocinético del polipéptido V_HH (derivados) con y sin un grupo prolongador diácido C18.

- 5 Formulaciones apropiadas de los polipéptidos V_HH anti-FX/FIX(a) (derivados) se administraron por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), respectivamente, a grupos de minicerdos (*Sus scrofa domesticus*). Se recolectaron muestras de sangre inmediatamente antes de la administración de la dosis y subsecuentemente en varios puntos temporales diferentes posteriores a la dosis. Se midieron las concentraciones plasmáticas de los polipéptidos V_HH (derivados) mediante el uso de un
- 10 inmunoensayo basado en etiquetado con His o basado en gamma-Glu, en el que se usaron un anticuerpo anti-V_HH (Novo Nordisk) hacia el polipéptido V_HH (derivado) junto con un anticuerpo anti-etiqueta His (R&D systems, MAB050) hacia la etiqueta His fusionado a la molécula de prueba o un anti-gamma-Glu (Novo Nordisk, Dinamarca) hacia el resto de prolongación de la molécula de prueba. Los dos montajes de inmunoensayo dieron sensibilidades similares, y el último se usó
- 15 cuando el compuesto polipeptídico V_HH no tenía etiqueta His fusionada a la molécula. Las placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, 439454) se recubrieron con la etiqueta His o el anticuerpo anti-gamma-Glu, se lavaron y se bloquearon mediante el uso de PBS; tween20 al 0.05 %; BSA al 1 %; pH 7.4. Después de una etapa de lavado, el calibrador específico derivado (0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2,000 pM) en muestras de plasma con EDTA al 1 % de cerdo y plasma con EDTA de cerdo en
- 20 una dilución mínima de 100x se incubaron en la placa, donde el derivado polipeptídico V_HH se capturó a través de su etiqueta His o el resto de prolongación gamma-Glu. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió un anticuerpo específico de V_HH interno biotinilado a la placa (0.5 nM) para preparar el ELISA tipo sándwich. Después de una etapa de lavado final, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a la placa como el reactivo de detección. La
- 25 cantidad de anticuerpo marcado con biotina unido al derivado polipeptídico V_HH se detectó después de la adición de un sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). Las lecturas de densidad óptica se midieron mediante el uso de un espectrómetro (por ejemplo, un espectrómetro SpectraMax® M2 (Molecular Devices)). La respuesta fue proporcional a la concentración de peroxidasa, que de nuevo fue proporcional a la concentración del derivado
- 30 polipeptídico V_HH. Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales se calcularon mediante el uso del programa informático de análisis estadístico de código abierto R (paquete 'NonCompart'). Los resultados se muestran en la tabla 18 más abajo para polipéptidos V_HH con y sin un prolongador

de ácidos grasos que confirma un efecto sobre la vida media de conjugaciones de prolongador de ácidos grasos para la extensión de la vida media como se observa en los ejemplos 11, 12 y 13.

Por tanto, las vidas medias observadas en cerdo aumentaron aproximadamente de 15 a 20 veces cuando los polipéptidos V_{HH} se conjugaron con un prolongador de ácido graso de diácido C18 en

5 comparación con los compuestos V_{HH} no prolongados.

10

15

20

25

30

Tabla 18: Datos PK de polipéptidos V_HH con mutaciones del pI manipuladas por ingeniería genética y conjugaciones de prolongadores de ácidos grasos probadas en modelo de cerdo.

ID de derivados	Prolongador, sitio de conjugación	pI	N (Grupo i.v. o s.c.)	Dosis (nmol/kg)	MRTHL i.v.* (Días)
Cpto #75	Sin prolongador	8.95	3 (s.c.)	30	0.59
Cpto #75	Sin prolongador	8.95	2 (i.v.)	30	0.24
Cpto #4	Diácido C18, Cys C-term	8.36	3 (i.v.)	5.3	3.6
Cpto #63	Diácido C18, Cys C-term	5.85	3 (i.v.)	4.8	4.7

* MRTHL: Vida media terminal tiempo medio de residencia. MRTHL se calcula como $MRT \cdot \ln(2)$.

Ejemplo 14: Efecto farmacodinámico de derivados polipeptídicos anti-FX/anti-FIX(a) optimizados en el modelo de hemorragia por transección por la vena de la cola (TVT) de ratón

La eficacia *in vivo* se probó en modelos de ratón con HA de hemorragia moderada. En el modelo TVT, se ha demostrado anteriormente que la administración de FVIII reduce la hemorragia al mismo nivel observado para ratones de tipo salvaje. Para superar la falta de reactividad entre especies de ratón de los compuestos probados, los ratones HA se complementaron con FIX y FX humanos antes de los experimentos de hemorragia. Al final del periodo de hemorragia, la pérdida total de sangre se determinó mediante medición espectrofotométrica de la hemoglobina. Los niveles plasmáticos de los derivados polipeptídicos V_HH indicados y el FIX se cuantificaron mediante un ensayo de canalización de oxígeno luminiscente mediante el uso de anticuerpos anti-V_HH (Novo Nordisk, Dinamarca) y anti-enlazador gammaGlu (Novo Nordisk, Dinamarca) y anticuerpos anti-FIX (LS-B7226, LSBio y FIX-2F24, clon interno), respectivamente. Los niveles de FX se cuantificaron mediante un ELISA de FX comercial (KSP134, Nordic Biosite). A partir de estudios de dosis-respuesta con los derivados polipeptídicos V_HH indicados, los valores de EC₅₀ se determinaron mediante el ajuste de los datos a una ecuación de respuesta logarítmica inversa (dosis) de tres parámetros con valores de meseta compartidos (> 0). Se aplicó la eliminación automática de valores atípicos con un coeficiente ROUT del 1 % y la suma de cuadrados se ponderó por (pérdida de sangre) mediante el uso del programa informático GraphPad Prism (versión 9.0.1).

Los estudios de dosis-respuesta mostraron una reducción significativa de la pérdida de sangre, alcanzando los niveles de pérdida de sangre observados en ratones de tipo salvaje para los derivados polipeptídicos V_HH probados en comparación con el grupo de vehículo y el grupo no hemofílico de tipo salvaje, respectivamente, como se muestra en la tabla 19. Los estimados de los intervalos de dosis efectivas de EC₅₀ se presentan en la tabla 20 mostrando una alta potencia, ya que se observó un efecto del 50 % a una dosis baja de nmol por kg para los 3 compuestos probados.

Tabla 19: Efecto de los derivados polipeptídicos anti-FX/anti-FIX(a) en el modelo de ratón con hemorragia TVT

Núm. de derivado / dosis (μmol/kg)	Tiempo de hemorragia (min, AVE ± SD, n = 6)	Pérdida de sangre (nmol, AVE ± SD, n = 6)
Vehículo	21.0 ± 3.5	4,594 ± 1,326
Tipo salvaje, no hemofílico	5.4 ± 0.4	879 ± 438
Cpto#4		
0.003 μmol/kg	25.8 ± 3.0	6,979 ± 1,281
0.005 μmol/kg	23.2 ± 6.7	6,204 ± 1,496
0.006 μmol/kg	19.7 ± 11.2	5,232 ± 3,698

0.010 $\mu\text{mol/kg}$	13.9 ± 8.7	$2,973 \pm 2,973$
0.013 $\mu\text{mol/kg}$	11.0 ± 8.6	$2,264 \pm 2,264$
Cpto#6		
0.003 $\mu\text{mol/kg}$	26.4 ± 4.4	$7,445 \pm 1,053$
0.005 $\mu\text{mol/kg}$	18.4 ± 6.7	$5,143 \pm 1,861$
0.006 $\mu\text{mol/kg}$	11.8 ± 9.6	$3,771 \pm 3,374$
0.010 $\mu\text{mol/kg}$	19.2 ± 10.9	$4,532 \pm 3,277$
0.013 $\mu\text{mol/kg}$	7.1 ± 4.3	$1,024 \pm 1,050$
Cpto#15		
0.0065 $\mu\text{mol/kg}$	9.5 ± 7.3	$2,408 \pm 2,391$
0.0065 $\mu\text{mol/kg}$	14.8 ± 8.3	$4,545 \pm 2,417$
0.0097 $\mu\text{mol/kg}$	7.0 ± 4.7	$1,223 \pm 1,163$
0.0129 $\mu\text{mol/kg}$	6.9 ± 1.7	$1,438 \pm 798$

Tabla 20: Estimados de EC_{50} de derivados polipeptídicos anti-FX/anti-FIX(a) a partir del modelo de ratón con hemorragia TVT

ID de derivados	EC_{50} Tiempo de hemorragia ($\mu\text{mol/kg}$)	EC_{50} Pérdida de sangre ($\mu\text{mol/kg}$)
Cpto#4	0.0097	0.0094
Cpto#6	0.0077	0.0087
Cpto#15	0.0047	0.0060

Ejemplo 15: Determinación de la actividad ex vivo de un derivado polipeptídico V_{HH} anti-FX/anti-FIX(a) optimizado después de la administración peroral

Después de un estudio farmacocinético (PK) en perros de tipo salvaje del ejemplo 12 para caracterizar la administración PO del cpto#6, se determinó la actividad cromogénica en dos puntos temporales separados a los 30 minutos y 90 minutos después de la administración de la dosis. La actividad cromogénica mimetizada con FVIII medida se comparó con la exposición plasmática del cpto#6 para determinar la fracción del derivado polipeptídico V_{HH} activo en suero después de la administración de la dosis por vía oral.

La actividad cromogénica del cpto#6 se determinó mediante el uso de un ensayo comercial de actividad cromogénica de FVIII (FVIII:C, Hyphen Biomed, Francia) para analizar muestras de suero de perros. Para la curva de calibración, se añadió el cpto#6 a suero de perro al 10 % y las muestras de suero se analizaron con dilución 10 veces mediante el uso del mismo ensayo. Los resultados de actividad finales se corrigieron con 10 veces para la dilución de 10 veces. Los niveles de exposición plasmática del cpto#6 se cuantificaron mediante un ensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI) mediante el uso de anticuerpos anti- V_{HH} (Novo Nordisk, Dinamarca) y anti-enlazador

gammaGlu (Novo Nordisk, Dinamarca). Los datos se resumen en la tabla 21. La actividad cromogénica de FVIII:C fue medible en suero 30 y 90 minutos posteriores a la administración de la dosis y la cuantificación del cpto#6 basado en la actividad cromogénica es similar al estimado basado en las mediciones de exposición plasmática del cpto#6 mediante el uso del ensayo LOCI. Se prevé que cualquier discrepancia en la cuantificación del cpto#6 sea provocada por diferencias en la sensibilidad del ensayo. Los datos muestran que el derivado polipeptídico V_{HH} administrado por vía oral es totalmente activo tras la absorción oral en perros, lo que indica que es posible el concepto de producir un fármaco mimético de FVIII disponible por vía oral para tratar a pacientes, que padecen, por ejemplo, hemofilia A.

Tabla 21: Actividad *ex vivo* del derivado polipeptídico anti-FX/anti-FIX(a) después de la administración PO

Tiempo después de la dosis por vía peroral	Animal	Actividad cromogénica de FVIII:C (pM, suero)	Exposición del cpto#6 (pM, plasma)	Actividad/exposición Relación%
30 minutos	Animal 1	633	414	153 %
	Animal 2	1,740	905	192 %
	Animal 3	445	247	180 %
	Animal 4	1,930	1,490	129 %
90 minutos	Animal 1	1,640	1,290	127 %
	Animal 2	3,820	3,130	122 %
	Animal 3	2,470	2,110	117 %
	Animal 4	7,920	6,550	121 %

Ejemplo 16: Cristalización y mapeo de parátipo/epítipo del fragmento VHH anti-FX cpto#76

El propósito del presente estudio fue determinar los residuos de parátipo y epítipo del fragmento VHH designado como cpto #76 (VHH-1.15).

Cristalización

Los cristales del fragmento VHH cpto #76 producidos mediante el uso de CHO mezclados en una relación molar 1:4 con un péptido sintético N-term-NPFDLLD-C-term, correspondiente a la secuencia del péptido de activación aa31-37 del FX humano (adquirido de Apigenex) como se identificó en el ejemplo 4, se cultivaron mediante el uso de la técnica de difusión de vapor de gota sentada. Una solución proteica de 250 nl de complejo 5.75 mg/ml en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM se mezcló con 250 nl de Tacsimate al 4 % (v/v) (ácido malónico 1.8305 M, citrato tribásico de amonio 0.25 M, ácido succínico 0.12 M, ácido DL-málico 0.3 M, acetato de sodio trihidratado 0.4 M, formiato de sodio 0.5 M y tartrato dibásico de amonio 0.16 M) pH 5.0, polietilenglicol 3350

al 12 % (p/v) como precipitante y se incubó sobre 80 µl de precipitante. Después de 5 días de incubación a 18 °C, la placa de cristalización se transfirió a 5 °C. Los cristales aparecieron en un plazo de tres meses.

Recogida de datos de difracción

- 5 El cristal se protegió en frío en precipitante con etilenglicol al 20 % añadido antes del enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. Los datos de difracción se recolectaron a 100K en el rayo de luz X10SA de Swiss Light Source (longitud de onda 1.0000 Å) mediante el uso de un detector de píxeles Eiger2 16M de Dectris. La autoindexación, integración y escalado de los datos se realizaron con los programas del paquete XDS (las estadísticas de los datos de difracción se resumen en la tabla 22).

10 Determinación y refinamiento de la estructura

- La unidad asimétrica contiene dos complejos cpto #76:FX AP 31-37. La estructura se determinó por sustitución molecular mediante el uso de Phaser como se implementa en el paquete de programas Phenix mediante el uso de una estructura cristalina determinada previamente de un V_HH relacionado como modelo de investigación, ver el ejemplo 6. Se introdujo la secuencia de aminoácidos correcta del cpto #76 y FX AP 31-37 se construyó manualmente en el mapa de densidad de electrones de diferencia, todo mediante el uso de COOT. Durante las rondas de refinamiento en Phenix y la reconstrucción manual en COOT, se observó y modeló la O-glicosilación en el residuo de treonina 117 y la sulfatación del residuo de tirosina 109. Las estadísticas del refinamiento se encuentran en la Tabla 22.

20 Tabla 22: Recogida de datos y estadísticas del refinamiento

	Longitud de onda (Å)	1
	Intervalo de resolución (Å)	41.89 - 1.7 (1.761 - 1.7)
	Grupo espaciador	P 4 ₁ 2 ₁ 2
	Celda unitaria (Å, grad)	66.54 66.54 161.74 90 90 90
	Reflexiones totales	534,639 (54,552)
	Reflexiones únicas	40,883 (4,000)
25	Multiplicidad	13.1 (13.6)
	Totalidad (%)	99.59 (99.48)
	Promedio I/sigma(I)	17.03 (0.83)
	Factor B de Wilson (Å ²)	35.51
	Fusión R	0.07098 (3.508)
	R-meas	0.07398 (3.642)
	R-pim	0.0206 (0.9736)
	CC1/2	0.999 (0.72)
30	CC*	1 (0.915)
	Reflexiones usadas en el refinamiento	40,750 (3,981)

	Reflexiones usadas para la R libre	1,993 (193)
	Trabajo R	0.1828 (0.3798)
	R libre	0.2077 (0.4038)
	CC(trabajo)	0.963 (0.862)
	CC(libre)	0.949 (0.702)
5	Cantidad de átomos que no son hidrógeno	2.225
	macromoléculas	1,958
	ligandos	84
	solvente	217
	Residuos de proteínas	254
	RMS(uniones)	0.010
	RMS(ángulos)	1.15
	Ramachandran favorecido (%)	96.67
10	Ramachandran permitidos (%)	2.92
	Valores atípicos de Ramachandran (%)	0.42
	Valores atípicos de rotámeros (%)	0.50
	Puntaje	3.59
	Factor B promedio (Å ²)	47.24
	macromoléculas	46.21
	ligandos	71.05
	solvente	51.13
15	Cantidad de grupos TLS	1

Las estadísticas para la cubierta de mayor resolución se muestran entre paréntesis.

Determinación del epítipo y el parátipo

El epítipo del péptido sintético, definido como los residuos del péptido de activación de FX caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4.0 Å de un átomo pesado en el polipéptido V_{HH} cpto #76, comprende los siguientes residuos del péptido sintético N173, P174, F175, L177, L178 y D179 de acuerdo con la secuencia del péptido de activación de FX correspondiente basada en la numeración consecutiva (SEQ ID NO:2).

El parátipo del fragmento V_{HH} cpto #76, definido como residuos del cpto #76 caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) a una distancia de 4.0 Å de un átomo pesado en el péptido sintético, comprende los siguientes residuos del cpto #76: A33, M34, G35, W47, V48, A49, A50, I51, S52, S57, T58, N59, Y60, A61, A97, A98, D99, G105, L107, Y109 (SEQ ID NO:734) (numeración consecutiva).

Ejemplo 17: Cristalización y mapeo de parátipo/epítipo del fragmento VHH anti-FX cpto#77

El propósito del presente estudio fue determinar los residuos de parátipo y epítipo del fragmento V_{HH} designado Cpto #77 (V_{HH}1.13).

Cristalización

Los cristales del fragmento V_HH cpto #77 producidos a partir de CHO mezclados en una relación molar 1:4 con un péptido sintético N-term-NPFDLLD-C-term, correspondiente a la secuencia del péptido de activación aa31-37 del FX humano (sintetizado por Apigenex) se cultivaron mediante el uso de la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Una solución proteica de 250 nl de complejo 6.1 mg/ml en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM se mezcló con 250 nl de Tacsimate al 3 % (v/v) (ácido malónico 1.8305 M, citrato tribásico de amonio 0.25 M, ácido succínico 0.12 M, ácido DL-málico 0.3 M, acetato de sodio trihidratado 0.4 M, formiato de sodio 0.5 M y tartrato dibásico de amonio 0.16 M) pH 4.0, PEG 3350 al 11 % (p/v) como precipitante y se incubó sobre 80 µl de precipitante. El cristal apareció a 4 días de incubación a 5 °C.

Recogida de datos de difracción

El cristal se protegió en frío en precipitante con etilenglicol al 20 % añadido antes del enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. Los datos de difracción se recolectaron a 100K en el rayo de luz X10SA de Swiss Light Source (longitud de onda 1.0000 Å) mediante el uso de un detector de píxeles Eiger2 16M de Dectris. La autoindexación, integración y escalado de los datos se realizaron con los programas del paquete XDS (las estadísticas de los datos de difracción se resumen en la Tabla 23).

Determinación y refinamiento de la estructura

La unidad asimétrica contiene dos complejos cpto #77:FX AP 31-37. La estructura se determinó por reemplazo molecular mediante el uso de Phaser como se implementó en el conjunto de programas Phenix mediante el uso de la unidad asimétrica completa de la estructura cristalina del cpto #76:FX AP 31-37 en el ejemplo 16 como modelo de búsqueda. Se introdujo la secuencia de aminoácidos correcta del cpto #77 y se aplicaron rondas de refinamiento en Phenix y reconstrucción manual en COOT. Las estadísticas del refinamiento se encuentran en la Tabla 23.

Tabla 23: Recogida de datos y estadísticas del refinamiento

Longitud de onda (Å)	1.0000
Intervalo de resolución (Å)	32.88 - 1.7 (1.761 - 1.7)
Grupo espaciador	P 4 ₁ 2 ₁ 2
Celda unitaria (Å, grad)	58.99 58.99 160.25 90 90 90
Reflexiones totales	418,459 (41,888)
Reflexiones únicas	31,790 (3,080)
Multiplicidad	13.2 (13.6)
Totalidad (%)	98.90 (97.90)
Promedio I/sigma(I)	16.44 (1.79)
Factor B de Wilson (Å ²)	26.81
Fusión R	0.08787 (1.558)

	R-meas	0.09151 (1.618)
	R-pim	0.02521 (0.4322)
	CC1/2	0.999 (0.762)
	CC*	1 (0.93)
	Reflexiones usadas en el refinamiento	31,765 (3,079)
5	Reflexiones usadas para la R libre	1,588 (154)
	Trabajo R	0.1717 (0.2765)
	R libre	0.2112 (0.3009)
	CC(trabajo)	0.960 (0.903)
	CC(libre)	0.935 (0.883)
	Cantidad de átomos que no son hidrógeno	2.253
	macromoléculas	1,971
10	ligandos	50
	solvente	232
	Residuos de proteínas	254
	RMS(uniones)	0.011
	RMS(ángulos)	1.03
	Ramachandran favorecido (%)	98.33
	Ramachandran permitidos (%)	1.67
	Valores atípicos de Ramachandran (%)	0.00
15	Valores atípicos de rotámeros (%)	0.49
	Puntaje	3.83
	Factor B promedio (Å ²)	35.30
	macromoléculas	33.83
	ligandos	66.50
	solvente	41.00
	Cantidad de grupos TLS	1

20 Las estadísticas para la cubierta de mayor resolución se muestran entre paréntesis.

Determinación del epítipo y el parátipo

El epítipo del péptido sintético, definido como los residuos del péptido de activación de FX caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4.0 Å de un átomo pesado en el fragmento V_HH cpto #77, comprende los siguientes
25 residuos del péptido sintético N173, P174, F175, L177, L178 y D179 de acuerdo con la secuencia del péptido de activación de FX correspondiente basada en la numeración consecutiva (SEQ ID NO:2).

El parátipo del fragmento V_HH cpto #77, definido como residuos del cpto #77 caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) a una distancia de 4.0 Å de un átomo
30 pesado en el péptido sintético, comprende los siguientes residuos del cpto #77:

A33, M34, G35, W47, V48, A49, A50, I51, S52, S57, T58, N59, Y60, A61, A97, A98, D99, G105, L107, Y109 (SEQ ID NO:735)

(numeración consecutiva).

Ejemplo 18: Cinética de generación de FXa en estado estacionario de V biespecífico_HDerivados polipeptídicos H

El propósito del presente estudio fue determinar la actividad procoagulante de los derivados polipeptídicos V_HH biespecíficos anti-FIXa/FX en base a su capacidad para promover la activación de FX por FIXa en presencia de una membrana de fosfolípido procoagulante. Los compuestos probados se enumeran en la Tabla 24 y se incluyó SIA de emicizumab para comparación.

La actividad de generación de FXa en estado estacionario de cada compuesto se informa como los parámetros de la cinética de Michaelis-Menten (constante de Michaelis (K_M) y la constante de velocidad de primer orden (k_{cat}/K_M)) a una concentración compuesta dada. Los compuestos, cuya concentración de ensayo final se muestra en la Tabla 24, se preincubaron con 0.1 nM de FIXa derivado de plasma humano (Haematologic Technologies Inc, EE. UU.) y vesículas de fosfolípidos de fosfatidilserina:fosfatidilcolina 25:75 a 20 μ M (Haematologic Technologies Inc, EE. UU.) en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl 5 mM₂, 0.1 % (p/v) PEG8000, pH 7.3 + 1 mg/ml BSA) durante 5 min. Después, la activación se inició mediante la adición de una serie de diluciones de dos veces de FX derivado de plasma humano (Haematologic Technologies Inc, EE. UU.) que comenzó a 500 nM. Después de la activación a temperatura ambiente durante 7 minutos, la reacción (50 μ l) se inactivó mediante la adición de 25 μ l de tampón de inactivación (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 60 mM, PEG8000 al 0.1 %, pH 7.3 + 1 mg/ml de BSA). La cantidad de FXa generada se determinó mediante la adición de 25 μ l de sustrato cromogénico S-2765 2 mM (Chromogenix, Suecia) y la medición de la conversión del sustrato cromogénico mediante la medición de absorbancia a 405 nm (Δ OD/min) en un lector de microplacas. De manera similar, la activación de FX por FIXa libre se determinó a una concentración de FIXa de 10 nM y un tiempo de reacción de 5 a 10 min. Para convertir la absorción medida a 405 nm a una concentración de FXa correspondiente, se añadió una curva estándar de FXa de 0-5 nM (50 μ l) con 25 μ l de tampón de inactivación y 25 μ l de sustrato cromogénico S-2765 2 mM antes de que se registrara la absorción a 405 nm como se describió anteriormente. La regresión lineal de Δ OD/min como una función de la concentración de FXa produce una pendiente que puede usarse para convertir Δ OD/min medido en velocidad de generación de FXa:

Velocidad de generación de FXa = (Δ OD/min) / (pendiente_{curva estándar de FXa} * tiempo de reacción)

Los parámetros cinéticos de estado estacionario de Michaelis-Menten se determinan mediante el ajuste de la velocidad de generación de FXa como una función de la concentración de FX (sustrato) a la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad de generación de FXa} = (k_{\text{cat}} * [\text{FIXa}]_t * [\text{FX}]_i) / (K_M + [\text{FX}]_i)$$

- 5 donde k_{cat} es la eficiencia enzimática (min^{-1}), $[\text{FIXa}]_t$ es la concentración total de FIXa (enzima) (nM), $[\text{FX}]_i$ es la concentración total de FX (sustrato) (nM) y K_M es la constante de Michaelis (nM). La Tabla 24 enumera las constantes cinéticas en estado estacionario determinadas para cada compuesto probado, así como también la concentración probada.

Tabla 24: Constantes cinéticas enzimáticas en estado estacionario determinadas

10	ID de derivado polipeptídico V _{HH} / nombre de anticuerpo	Concentración probada (nM)	K _M (nM)	k _{cat} /K _M (1/(min*nM))
	Cpto #21	5	3.9	0.27
	Cpto #8	5	4.8	0.27
	Cpto #17	5	9.0	0.15
	Cpto #19	5	8.2	0.30
	Cpto #16	5	7.1	0.14
15	Cpto #15	5	6.9	0.25
	Cpto #13	5	6.2	0.18
	Cpto #6	5	5.9	0.33
	SIA de emicizumab	300	53.5	0.03
	FIXa libre (10 nM)	N/A	281.5	0.00012

20 Conclusión

Todos los derivados polipeptídicos V_{HH} biespecíficos anti-FIXa/FX disminuyen K_M de 281.5 nM de FIXa libre a entre 3.9-9.0 nM cuando se complementa a una concentración final de 5 nM, y aumentan aún más la eficiencia catalítica de 0.00012 $\text{min}^{-1}\text{nM}^{-1}$ a entre 0.14-0.33 $\text{min}^{-1}\text{nM}^{-1}$. En comparación, SIA de emicizumab a 300 nM disminuye K_M a 53.5 nM.

- 25 Los valores de K_M reducidos reflejan un ensamble mejorado (disposición espacial) de FIX(a)/FX que conduce a un aumento significativo de la potencia de los derivados polipeptídicos V_{HH}. Todos los compuestos se prueban en concentraciones farmacológicamente relevantes esperadas.