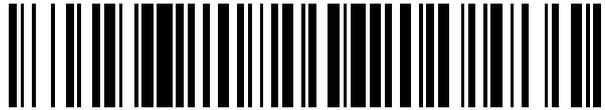


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 432**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2012 PCT/EP2012/065782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13024059**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2012 E 12746095 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 2744822**

54 Título: **Proteínas y péptidos modificados**

30 Prioridad:

**17.08.2011 US 201161524488 P  
12.12.2011 GB 201121226  
12.12.2011 GB 201121233  
12.12.2011 GB 201121236  
25.07.2012 WO PCT/EP2012/064632**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.03.2021**

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road, Brentford  
Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**ASHMAN, CLAIRE;  
BIRCHLER, MARY;  
DE WILDT, RUDOLF M T;  
HOLLAND, CLAIRE;  
LEWIS, ALAN PETER;  
MORLEY, PETER;  
SANDAL, THOMAS y  
STEWART, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 813 432 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

### Proteínas y péptidos modificados

La presente invención se refiere a proteínas y péptidos modificados que tienen una capacidad reducida para unirse a anticuerpos preexistentes. Dichas moléculas de proteína/péptido modificadas comprende extensiones en el extremo C terminal. Dichas moléculas modificadas (incluidas fusiones y conjugados de las mismas) comprenden moléculas de unión a antígeno, que son dominios variables únicos de inmunoglobulina humana (anticuerpo). La invención también se refiere a usos, formulaciones, composiciones que comprenden tales moléculas modificadas extendidas en su extremo C terminal.

### Antecedentes de la invención

En los seres humanos existen autoanticuerpos naturales que pueden unirse a proteínas, por ejemplo, a inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas huéspedes, por ejemplo el factor reumatoide (que se unen a epítomos en la región Fc de anticuerpos), autoanticuerpos antiidiotipo (que se unen a regiones variables/CDR de anticuerpos) y autoanticuerpos antibisagra (que se unen a la región bisagra del dominio constante de Ig en fragmentos Fab).

Estos autoanticuerpos pueden ser parte de un repertorio policlonal de autoanticuerpos antiinmunoglobulina (Ig) con especificidad hacia epítomos a lo largo de la molécula de Ig que están presentes tanto en seres humanos como en primates no humanos. Además de los autoanticuerpos anti-IgG que se unen a epítomos dentro del dominio Fc intacto (es decir, los factores reumatoides (FR)), se ha observado también la presencia de autoanticuerpos anti-idiotípicos que se unen a regiones CDR variables de IgG y de anticuerpos anti-bisagra que reaccionan con epítomos crípticos en las regiones bisagra C terminales de fragmentos de Fab o F('Ab')<sub>2</sub>. El papel funcional de estos autoanticuerpos anti-IgG diferentes permanece indeterminado. El factor reumatoide y los autoanticuerpos antibisagra se han asociado con determinadas afecciones patológicas tales como autoinmunidad y determinadas infecciones, mientras que los anticuerpos antiidiotípicos pueden conferir protección frente a autoanticuerpos en determinadas enfermedades autoinmunitarias. Además, se ha propuesto un papel inmunorregulador para autoanticuerpos anti-IgG en el que estos autoanticuerpos controlan la estimulación de linfocitos B autorreactivos y regulan respuestas inmunitarias a antígenos extraños. Los anticuerpos antibisagra son autoanticuerpos anti-IgG que reacciona con IgG escindida pero no intacta. Su alta prevalencia en la población humana normal implica una exposición previa a fragmentos de IgG, posiblemente como resultado de la escisión de IgG por proteasas bacterianas o endógenas.

Además de unirse a proteínas endógenas (presentes en sujetos sin tratamiento previo), los autoanticuerpos también pueden unirse a proteínas o péptidos que se administran al sujeto para el tratamiento. Los anticuerpos preexistentes que se unen a moléculas tales como proteínas y péptidos terapéuticos administrados a un sujeto pueden afectar a su eficacia y podrían dar como resultado reacciones de administración, hipersensibilidad, respuesta clínica alterada en pacientes tratados así como biodisponibilidad alterada manteniendo, eliminando o neutralizando la molécula. No obstante, en algunos casos, la existencia de estos anticuerpos puede ser menos significativa durante el tratamiento farmacológico que en otros casos.

Los autoanticuerpos y anticuerpos que se unen a proteínas terapéuticas de formación reciente en respuesta al tratamiento farmacológico (como administración de una proteína o péptido terapéutico) se denominan colectivamente anticuerpos antifármaco (ADA). Cuando los ADA se describen a lo largo del presente documento nos referimos a ADA preexistentes, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los anticuerpos de dominio VH y VL están derivados de secuencias estructurales totalmente humanas y aunque las predicciones *in silico* describen una incidencia marcadamente baja de péptidos potencialmente inmunogénicos, es posible que estos anticuerpos de dominio puedan ser inmunogénicos en seres humanos, es decir, podrían producir ADA y podrían unirse a ADA preexistentes dependiendo de factores dependientes de la secuencia e independientes de la secuencia.

De forma similar, una serie de dAb únicos derivados de cadena pesada de camélido (VHH) está en investigación clínica y aunque no se ha informado de hipersensibilidad u otros acontecimientos adversos mediados inmunitariamente, la unión a ADA preexistentes permanece siendo una posibilidad.

El documento WO 2008/149143 y el documento WO 2008/149148 describen ambos ciertos dAb de TNFR1 que incluyen el diseñado Dom 1h-131-206 y también las propiedades y usos de tales dAb. Estos dAb tienen un extremo C-terminal que no está modificado y, por lo tanto, termina en la secuencia VTVSS.

Por lo tanto, podría ser ventajoso proporcionar moléculas para terapia que comprendan proteínas o péptidos, por ejemplo moléculas de unión a antígeno que tengan una capacidad reducida para unirse a ADA preexistentes cuando se administran a un sujeto, en particular a un sujeto humano)

### Sumario de la invención

Hemos demostrado, tal como se describe en el presente documento, que en sueros de algunos sujetos humanos sanos sin tratamiento previo están presentes autoanticuerpos anti-VH preexistentes que pueden unirse tanto a anticuerpos de dominio VH como a moléculas VHH, así como autoanticuerpos anti-VL (por ejemplo V kappa (VK)) que pueden unirse a moléculas VL. Los ADA preexistentes que se unen a dAb VH son similares a anticuerpos antibisagra en que se unen a fragmentos de IgG pero no a esas mismas secuencias encontradas *in situ* en IgG intacta.

Se desarrolló un inmunoensayo específico tal como se describe en el presente documento y se validó para detectar anticuerpos antifármaco al dAb VH DOM1H-131-206 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 1) en seres humanos. Se analizó un panel de muestras de suero de 60 donantes humanos sanos para determinar la reactividad

de fondo en el ensayo. Se determinó que aproximadamente el 45 % de las muestras de suero de estos sujetos tenía anticuerpos detectables que eran capaces de unirse a DOM1h-131-206. Esta reactividad parece específica para un epítipo, o epítipos, neo dentro de la secuencia estructural de dAb VH, ya que la respuesta tuvo reactividad cruzada con los marcos estructurales de VH de dAb que se unen a diversos antígenos diana, pero no con IgG totalmente humana. También se observó ADA preexistente a dAb VL en muestras de suero de donantes humanos sanos pero en una medida más baja que VH.

Tomando un enfoque de mutagénesis determinamos si las modificaciones en el marco estructural VH podrían reducir la unión de estos ADA preexistentes. Usando este enfoque cartografiamos un epítipo al extremo C terminal del marco estructural de dAb VH y ejemplificamos una serie de enfoques que pueden usarse para reducir o eliminar la unión de los anticuerpos preexistentes a moléculas VL, VH y VHH. En particular, hemos demostrado que las modificaciones que alteran la conformación tridimensional del extremo C terminal de dAb, en particular el resto serina C terminal (es decir, en la posición de Kabat 113) en dAb VH y VHH son importantes. Además, la conformación tridimensional del extremo C terminal de dAb puede alterarse mediante la adición de restos de aminoácidos adicionales (extensión C terminal) y/o sustituyendo los restos de aminoácidos presentes en una o varias de las posiciones 14, 41, 108, 110 y 112 en dAb VH.

La presente invención proporciona, por lo tanto, moléculas modificadas que tienen capacidad reducida para unirse a ADA (preexistentes) en comparación con la molécula no modificada y que son adecuados para su administración a un sujeto, por ejemplo un sujeto humano, para terapia o prevención. Por capacidad reducida para unirse se pretende decir que la molécula se une con afinidad reducida o avidéz reducida a un ADA preexistente.

Adicionalmente, las moléculas modificadas descritas en el presente documento y las composiciones farmacéuticas que comprenden estas moléculas modificadas pueden tener un perfil de seguridad potenciado y menos efectos secundarios que las moléculas no modificadas, por ejemplo dAb no modificados, que no comprenden una extensión, adición, delección o etiqueta C terminal y/u otras modificaciones estructurales, para reducir la unión a ADA preexistente. De forma similar, la administración de las moléculas modificadas descrita en el presente documento o de composiciones farmacéuticas que comprenden estas moléculas modificadas (que tienen capacidad reducida para unirse a ADA preexistente) puede causar una inmunogenicidad modificada y dar como resultado, también, una eficacia mejorada y un perfil de seguridad mejorado y, por ejemplo, puede usarse ventajosamente para repetir la dosificación a pacientes que podrían desarrollar autoanticuerpos frente a las moléculas no modificadas, por ejemplo dAb.

Por lo tanto, en un primer aspecto de la invención se proporciona: un dominio variable de inmunoglobulina único (dAb) que se une a TNFR1 y que se selecciona de cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: (a) DOM1h-131-206 caracterizada por la SEQ ID NO:16; y (b) una secuencia de aminoácidos que es el 98 %, el 99 % o el 99,5 % idéntica a la secuencia DOM1h-131-206 mostrada en la SEQ ID NO: 1 y a la que se le ha añadido una extensión de una única alanina en el extremo C-terminal y que tiene una unión de ADA reducida en comparación con la SEQ ID NO: 1 no modificada.

En un aspecto de la divulgación, la extensión C terminal puede ser una extensión de 1-15 aminoácidos, por ejemplo de 1 a 8 aminoácidos o 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 aminoácidos. En particular, una extensión de 1 a 8 aminoácidos, o 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 aminoácidos que comprende un resto de alanina, por ejemplo una extensión de solo una alanina, o una extensión de AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP. En particular se proporciona un extensión de 1-5 aminoácidos o una extensión de 1-4 aminoácidos. El dominio variables de inmunoglobulina único modificado también puede comprender una delección de aminoácidos. El dominio variable de inmunoglobulina único (dAb) puede estar seleccionado de un VH humano o dAb VL humano o un VHH de camélido. La extensión C terminal puede estar presente como una fusión directa o un conjugado con el extremo C terminal del dAb.

En un aspecto, los dAb modificados para reducir la unión a ADA tal como se describe en el presente documento tienen una KD de unión a ADA que es el 150 % o más (por ejemplo, el 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % o más) de la KD de un equivalente de una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina único (dAb) pero no modificada. La divulgación también proporciona un dAb modificado tal como se describe en el presente documento que tiene unión reducida a ADA y que tiene unión reducida a ADA tal como se determina usando un ensayo de confirmación tal como se describe en el ejemplo 2 y en el que dicho dAb tiene un % medio de inhibición de la señal que es menos del 90 %, por ejemplo menos del 80 %, por ejemplo menos del 70 %, por ejemplo menos del 60 %, por ejemplo menos del 50 %, por ejemplo menos del 40 %, por ejemplo menos del 30 %, por ejemplo menos del 20 %, por ejemplo menos del 10 %, en comparación con el dAb control que tiene aproximadamente el 98 %-100 % de inhibición del señal, teniendo dicho dAb control (no modificado) la misma secuencia o una similar pero no está modificado para reducir la unión a ADA.

La presente invención también proporciona un dominio variable de inmunoglobulina único (dAb) de la invención para su uso en terapia, por ejemplo, para su uso en la prevención de efectos secundarios. El dAb modificado tal como se describe en el presente documento de tal modo que tiene una unión reducida a ADA es para su uso en un régimen de tratamiento que implica dosificación repetida.

La divulgación proporciona un dominio variable de inmunoglobulina único (dAb) en el que la diana es TNFR1 y que es un dAb seleccionado entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos siguientes identificadas como: (a) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16) (b) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal y una mutación estructural P14A (SEC ID N° 17) (c) dAb DOM1h-131-206 con una sustitución estructural P14A (SEC ID N° 18) (d) dAb DOM1h-131-206 con una extensión ASTKG C terminal (SEC ID N° 19) (e) dAb DOM1h-131-206 con una extensión ASTKG C terminal y una mutación estructural P14A (SEC ID N° 20). La divulgación también proporciona un dAb (no modificado) que está seleccionado de una secuencia que es el 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % o 80 % idéntica a una cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas como: DOM 1h-131-511 (SEC ID N° 2), DOM 1h-131-202 (SEC ID N° 3) y que además comprende algunas, incluida por ejemplo cualquiera, de las

modificaciones descritas en el presente documento que reducen la unión a ADA, por ejemplo una extensión C terminal de solo una alanina.

La divulgación también proporciona una secuencia de VHH con una cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento para reducir la unión a ADA, por ejemplo un VHH con una secuencia de aminoácidos que sea el 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % u 80 % idéntica a las secuencias de aminoácidos identificada como SEC ID N° 7-9.

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican los dAb de la invención, por ejemplo el ácido nucleico que tiene la secuencia de la SEC ID N° 22 que codifica el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal, un vector que comprende el ácido nucleico (SEC ID N° 22) y proporciona también una célula huésped, por ejemplo una célula huésped de E.coli, que expresa el ácido nucleico (SEC ID N° 22), o un vector tal como el Pave011 (de Fujifilm Diosynth) que expresa SEC ID N° 22. También se proporciona mediante la divulgación un procedimiento de producción del dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal que comprende retener una célula huésped tal como E.coli que comprende un vector tal como Pave011 (o ácido nucleico) que codifica ácidos nucleicos (SEC ID N° 22) en condiciones adecuadas para la expresión del dAb extendido produciendo por lo tanto el polipéptido.

Los dAb de la invención también pueden estar presentes como fusiones o conjugados con otras moléculas.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden dAb según cualquier aspecto o realización de la invención, por ejemplo en combinación con vehículo(s), excipiente(s) o diluyente(s) farmacéutica o fisiológicamente aceptable(s).

La invención también proporciona usos de los dAb de la invención para terapia o medicina y usos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos.

En un aspecto la invención proporciona el uso del dAb DOM1h-131-206 con una extensión de alanina C terminal (SEC ID N° 16) para su uso en terapia o medicina o como medicamento, por ejemplo para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno inflamatorio o una enfermedad o trastorno respiratorio o pulmonar tal como lesión pulmonar aguda (LPA) y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA) y complicaciones de los mismos.

En otro aspecto la divulgación proporciona formulaciones que comprenden los dAb de la invención con unión a ADA reducida, por ejemplo formulaciones nebulizables para administración pulmonar. También se proporcionan dispositivos nebulizadores o inhaladores que comprenden los dAb de la invención, por ejemplo uno cualquiera de los dAb anti-TNFR1, por ejemplo aquellos con secuencias de aminoácidos que se muestran en la figura 8a-8e: SEC ID N° 16-20, por ejemplo el dAb DOM1h-131-206 con una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16).

En otro aspecto la invención proporciona el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C (SEC ID N° 16), para tratar psoriasis.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para tratar psoriasis en un ser humano que comprende las etapas de a) identificar un ser humano con psoriasis; y b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del dAb DOM1h-131-206 modificado de cualquiera de las maneras descritas en el presente documento para reducir la unión a ADA, por ejemplo el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C (SEC ID N° 16) a una placa psoriática de un ser humano con psoriasis; con lo que se trata la psoriasis.

Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo de dominio para su uso en el tratamiento de psoriasis y también un régimen de dosificación para usar un anticuerpo de dominio para su uso en el tratamiento de psoriasis. El anticuerpo de dominio puede ser el dAb DOM1h-131-206 (SEC ID N° 1) no modificado o el dAb DOM1h-131-206 modificado de cualquiera de las maneras descritas en el presente documento para reducir la unión a ADA, por ejemplo el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16).

En otro aspecto la divulgación también proporciona un mAb tool (por ejemplo el mAb tool tal como se describe en el ejemplo 19 y con la secuencia de aminoácidos dada en la figura 6: SEC ID N° 14 y 15). El mAb tool se generó usando tecnología de anticuerpos monoclonales de ratón estándar, es decir, los ratones se inmunizaron con DOM 1H-131-206 (SEC ID N° 1), se recogieron bazos y se generaron líneas celulares de hibridoma, después los hibridomas que expresan anticuerpos se clonaron y el anticuerpo resultante se aisló y se secuenció usando técnicas estándar. El mAb tool es uno que se une al marco estructural dAb VH y por lo tanto reduce la unión de los dAb VH a ADA. Por lo tanto, el mAb tool parece que se une a un epítipo similar en el marco estructural VH al ADA anti-VH humano. Por lo tanto, el mAb tool puede ser útil, por ejemplo puede usarse para analizar dAb (VH, VHH) modificados, y para determinar que modificaciones del dAb previenen o reducen la unión del dAb al mAb tool. Las modificaciones de los dAb VH que previenen la unión al mAb tool también prevendrán o reducirán la unión de dAb VH a los ADA. Por lo tanto, la divulgación proporciona cualquier dAb que están modificado (por ejemplo con cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento) para prevenir o reducir la unión al mAb tool. La divulgación también proporciona un procedimiento de uso de un mAb tool (por ejemplo el mAb tool descrito en el ejemplo 19 y con la secuencia de aminoácidos dada en el ejemplo 19 y también en la figura 6: SEC ID N° 14 y 15) en un ensayo para analizar dAb, por ejemplo dAb (por ejemplo (VH, VHH) modificados, por ejemplo cualquiera de los descritos en el presente documento, por ejemplo dAb TNFR1 tales como los descritos en el presente documento) y para determinar aquellos con unión reducida a ADA, por ejemplo. En un aspecto los dAb (por ejemplo (VH, VHH) están modificados para reducir su unión al mAb tool tal como se describe en el presente documento y tienen una KD de unión al mAb tool que es el 150 % o más (por ejemplo, el 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % o más) de la KD de una secuencia de dAb equivalente que no ha sido modificada. La invención también proporciona cualquier dAb identificado mediante este ensayo de análisis.

En otro aspecto la divulgación también proporciona el uso de un mAb tool (por ejemplo el mAb tool tal como se describe en el ejemplo 19 y con la secuencia de aminoácidos dada en la figura 6: SEC ID N° 14 y 15) en un

procedimiento de ensayo para cuantificar cuanto dAb (por ejemplo VH, VHH) está presente en una muestra de tejido o en una muestra de plasma.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: muestra la frecuencia de anticuerpo antifármaco preexistentes en sueros de un panel de sujetos humanos sanos
- 10 Figura 2: muestra secuencias de aminoácidos de dAb anti-TNFR1 no modificados identificadas como (a) (no modificada) DOM 1H-131-206 (SEC ID N° 1) (b) (no modificada) DOM 1H-131-511 (SEC ID N° 2) (c) (no modificada) DOM 1H-131-202 (SEC ID N° 3; y secuencias VHH identificadas como (d) que es un formato biespecífico que tiene un módulo de unión a IL6R enlazado por GGGGSGGGGS a un módulo de unión a albúmina de suero humano tal como se describe en el documento WO2010100135 (SEC ID N° 4), (e) es un formato biespecífico que tiene un módulo de unión a TNF enlazado a un módulo de unión a albúmina de suero enlazado a su vez a un módulo de unión a TNF, usando GGGGSGGGGS como enlazador tal como se describe en el documento WO2010077422 (SEC ID N° 5), (f) es un formato mono-específico bivalente que comprende dos módulos idénticos enlazados por medio de un enlazador Ala-Ala-Ala, siendo cada módulo un dAb que puede unirse al dominio A1 del factor de Von-Willebrand, tal como se muestra en el documento WO2009115614A2 (SEC ID N° 6), (g) El clon de VHH2(d) es un formato biespecífico que tiene un módulo de unión a IL6R enlazado por medio de GGGGSGGGGS a un módulo de albúmina de suero humano tal como se describe en el documento WO2010100135 con una extensión de alanina (SEC ID N° 7) (h) formato bispecífico que tiene un módulo de unión a TNF enlazado a un módulo de albúmina de suero enlazado a su vez a un módulo de unión a TNF, usando GGGGSGGGGS como enlazador tal como se describe en el documento WO2010077422 con una extensión de alanina (SEC ID N° 8) (i) un formato mono-específico bivalente que comprende dos módulos idénticos enlazados por un enlazador Ala-Ala-Ala, siendo cada módulo un dAb que puede unirse al dominio A1 del factor de Von-Willebrand tal como se muestra en el documento WO2009115614A2 con una extensión de alanina (SEC ID N° 9) (j) DOM 1H-574-208 (SEC ID N° 10) (k) fusión DOM 1H-574-208 – VL (SEC ID N° 11) (l) DT04-H-033 (SEC ID N° 12); (m) Dom10h-53-567 (SEC ID N° 13).
- 15 Figura 3: muestra un modelo de estructura cristalina de DOM1H-131-206 con restos destacados que producen un efecto sobre la unión a ADA cuando están mutados. Se elaboró la modelización de restos superficiales y los mutantes resultantes se analizaron en el ensayo de ADA para evaluar su unión a ADA preexistente (por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 2). Los restos indicados como 14 y “C term” se encontró que tenían un efecto fuerte sobre la unión a ADA cuando estaban mutados, los restos indicados como 112, 110, 108 y 41 se encontró que tenían un efecto moderado sobre la unión a ADA cuando estaban mutados y los restos 13, 11, 91, 43, 44, 83 y 84 se encontró que tenían un efecto leve sobre la unión a ADA cuando estaban mutados. Figura 4: muestra la eliminación de la unión a ADA provocada por la adición de una extensión de un único resto de aminoácido alanina a clones de VHH 2(d), 2(e) y 2(f).
- 20 Figura 5: muestra niveles de unión a ADA y de dAb V<sub>H</sub> o dAb V<sub>L</sub> o moléculas que comprenden estos dAb.
- 25 Figura 6a y 6b: muestra las secuencias de aminoácidos de mAb tool a (M2.3G10.1G06), la figura 6a muestra la secuencia de la cadena ligera (SEC ID N° 14); y la figura 6b muestra la secuencia de la cadena pesada. Las CDR se muestran subrayadas en la figura (SEC ID N° 15).
- 30 Figura 7: muestra de la señal de ensayo de competencia (eje x) en presencia de muestras de suero de sujetos con un intervalo de señal de ADA anti-VH preexistente. El suero de un intervalo de donantes humanos con ADA anti-VH preexistente compite con mAb anti-VH M2.3G10.1G06 por la unión a DOM 1H-131-206 dando como resultado la inhibición de la señal de ensayo de competencia.
- 35 Figura 8: muestra las secuencias de aminoácidos de dAb TNFR1 identificados como: (a) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina (SEC ID N° 16) (b) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina y una mutación estructural P14A (SEC ID N° 17) (c) dAb DOM1h-131-206 con una sustitución estructural P14A (SEC ID N° 18) (d) dAb DOM1h-131-206 con una extensión ASTKG C terminal (SEC ID N° 19) (e) dAb DOM1h-131-206 con una extensión ASTKG C terminal y una mutación estructural P14A (SEC ID N° 20).
- 40 Figura 9: muestra las secuencias de ácidos nucleicos de dAb TNFR1 (a) dAb DOM1h-131-206 (SEC ID N° 21) (b) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina C terminal (SEC ID N° 22) (c) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de ASTKG C terminal (SEC ID N° 23).
- 45 Figura 10: muestra las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (a) secuencia VHH que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la figura 2d (SEC ID N° 24) (b) secuencia VHH que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la figura 2e (SEC ID N° 25); (c) secuencia VHH que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la figura 2f (SEC ID N° 26), (d) secuencia VHH que es un formato biespecífico que tiene un módulo de unión a IL6R enlazado por GGGGSGGGGS a un módulo de unión a albúmina de suero humano con una extensión de solo una alanina (SEC ID N° 27), (e) secuencia VHH con la secuencia de aminoácidos mostrada en 2e que además comprende una extensión de solo una alanina (SEC ID N° 28), (f) secuencia VHH con la secuencia de aminoácidos mostrada en 2f que además comprende una extensión de solo una alanina (SEC ID N° 29).
- 50 Figura 11: muestra secuencias de aminoácidos de mAb:dAb VL (moléculas mAb IL-13: dAb IL-4Vκappa): (a) molécula 735 mAb-VL (dAb IL-13mAb: IL-4Vκappa) (SEC ID N° 30 y 31), (b) 150154 mAb-VL (SEC ID N° 32 y 33), (c) 15019 mAb-VL (SEC ID N° 34 y 35), (d) 15020 mAb-VL (SEC ID N° 36 y 37), (e) 15021 mAb-VL (SEC ID N° 38 y 39).
- 55 Figura 12: muestra secuencias de aminoácidos de (a) DMS30045: dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C terminal ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 40), (b) DMS30046: dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 41), (c) DMS30047 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C terminal menos R en el extremo C terminal ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 42), (d) DMS30048 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + A ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 43), (e) DMS30049 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + AAA ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 44), (f) DMS30050 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + T ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 45), (g) DMS30051 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal menos R C-terminal ((TGLDSP)x4), (SEC ID N° 46), (h) DMS30052 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-

044-085 C-terminal + A ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 47), (i) DMS30053 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal + AAA ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 48), (j) DMS30053 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal + T ((TGLDSP)x4) (SEC ID N° 49):

### **Descripción detallada de la invención**

5 En la presente memoria descriptiva, la invención se ha descrito, con referencia a las realizaciones, de un modo que permite que se escriba una memoria clara y concisa. Se pretende y debería apreciarse que las realizaciones pueden combinarse o separarse de forma variada sin apartarse de la invención.

10 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica (por ejemplo en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas estándar para procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase, en general, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc.) y procedimientos químicos.

15 La afinidad es la fuerza de unión de una molécula, por ejemplo una proteína de unión a antígeno de la invención, a otra, por ejemplo su antígeno diana, en un sitio de unión único. La afinidad de unión de una proteína de unión a antígeno a su diana puede determinarse mediante procedimientos estándar en equilibrio (por ejemplo ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™).

20 El término "epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a esa porción del antígeno que entra en contacto con un dominio de unión particular de una proteína de unión a antígeno, por ejemplo dAb. Un epítipo puede ser lineal o conformacional/discontinuo. Un epítipo conformacional o discontinuo comprende restos de aminoácidos que están separados por otras secuencias, es decir no están en una secuencia continua de la secuencia primaria del antígeno. Aunque los restos pueden ser de regiones diferentes de la cadena peptídica, están en proximidad estrecha en la estructura tridimensional del antígeno. En el caso de antígenos multiméricos, un epítipo conformacional o discontinuo puede incluir restos de diferentes cadenas peptídicas. Los restos particulares comprendidos dentro de un epítipo pueden determinarse mediante programas informáticos de modelos o mediante estructuras tridimensionales obtenidas mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como cristalografía de rayos X.

30 Un conjugado de dAb se refiere a una composición que comprende un dAb al que está conjugada químicamente otra molécula por medio de un enlace covalente o no covalente, preferentemente un enlace covalente. Dicho enlace covalente podría ser mediante un enlace peptídico o por otro medio tal como mediante una cadena lateral modificada. El enlace no covalente puede ser directo (por ejemplo, interacción electrostática, interacción hidrófoba) o indirecto (por ejemplo, mediante unión no covalente o asociados de unión complementarios (por ejemplo, biotina y avidina), en el que un asociado está unido covalentemente al fármaco y el asociado de unión complementario está unido covalentemente al dAb™). Cuando se usan asociados de unión complementarios, uno de los asociados de unión puede estar unido covalentemente al fármaco directamente o a través de un resto enlazante adecuado y el asociado de unión complementario puede estar unido covalentemente al dAb™ directamente o a través de un resto enlazador adecuado.

40 Tal como se usa en el presente documento, una fusión de dAb se refiere a una proteína de fusión que comprende un dAb y un fármaco polipeptídico. El dAb y el fármaco polipeptídico están presentes en forma de partes discretas (restos) de una cadena polipeptídica continua sencilla.

45 Tal como se usa en el presente documento, "fragmento", cuando se usa con referencia a un polipéptido, es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma como parte, pero no totalmente, de la secuencia de aminoácidos del polipéptido natural completo. Los fragmentos pueden ser "independientes" o comprendidos dentro de un polipéptido mayor del que forma una parte o región como región continua única en un polipéptido mayor único.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término mAbdAb se refiere a un anticuerpo monoclonal unido a otro dominio de unión, en particular un dominio variable único tal como un anticuerpo de dominio. Un mAbdAb tiene al menos dos sitios de unión a antígeno, al menos uno de los cuales es de un anticuerpo de dominio, y al menos uno es de un dominio VH/VL emparejado. Dichos mAbdAb se describen, por ejemplo, en el documento WO 2009/068649.

55 Tal como se usa en el presente documento, "péptido" se refiere a de aproximadamente dos a aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos conjuntamente mediante enlaces peptídicos. Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido" o "proteína" se refiere a al menos aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos conjuntamente mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos y las proteínas generalmente comprenden estructura terciaria y están plegadas formando dominios funcionales.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "región Fc de cadena sencilla de un anticuerpo" se refiere a una región Fc de cadena pesada de una IgG, tal como una IgG1, IgG2, IgG3, iGG4 o IgG4PE, o un anticuerpo de IgA. Una región Fc de cadena pesada sencilla puede comprender uno o varios de los dominios de anticuerpos de regiones constantes CH1, CH2 y CH3, por ejemplo las tres dominios de anticuerpos de regiones constantes o solo los dominios CH2 y CH3. Además de comprender uno o varios dominios de anticuerpos de regiones constantes CH1, CH2 y CH3, la región Fc de cadena pesada sencilla de un anticuerpo puede comprender también una región bisagra de un anticuerpo (dicha región normalmente se encuentra entre los dominios CH1 y CH2).

65 Tal como se usa en el presente documento, "funcional" describe un polipéptido o péptido que tiene actividad biológica tal como actividad de unión específica. Por ejemplo, el término "polipéptido funcional" incluye un anticuerpo

un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno diana a través de su sitio de unión a antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, "ligando diana" se refiere a un ligando que está unido específicamente o selectivamente mediante un polipéptido o péptido. Por ejemplo, cuando un polipéptido es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un dominio variable único de inmunoglobulina, el ligando diana puede ser cualquier antígeno o epítipo deseado. La unión al antígeno diana depende de que el polipéptido o péptido sea funcional.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo se refiere a IgG, IgM, IgA, IgD o IgE o un fragmento (tal como un Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fv enlazado a disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv enlazado a disulfuro, diacuerpo) bien derivado de cualquier especie que produce de forma natural un anticuerpo, o bien creado por tecnología de ADN recombinante; aislándolo bien de suero, linfocitos B, hibridomas, transfectomas, levadura o bien bacterias.

La expresión "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (VH, VHH, VL) que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones V o dominios. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo- o hetero-multímero) con otras regiones variables o dominios variables en los que las regiones o dominios no son necesarios para la unión a antígeno mediante el dominio variable de inmunoglobulina único (es decir, en los que el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" tal como se usa la expresión en el presente documento. Un "dominio variable de inmunoglobulina único" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" tal como se usa la expresión en el presente documento. Un "dominio variable de inmunoglobulina" es en una realización un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo únicos de otras especies tales como roedores (por ejemplo, tal como se divulga en el documento WO 00/29004), tiburón nodriza y dAb de VHH de camélido. El VHH de camélidos son polipéptidos en el dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen camellos, llamas, alpacas, dromedarios y guanacos, que producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. El VHH puede estar humanizado. También dentro del alcance de la presente invención están dAb humanos que han sido modificados de tal modo que no son totalmente humanos, por ejemplos modificaciones que se han realizado para reducir la agregación, incluidas mutación de los mismos restos que son motivos de camélido.

Un dominio variable único de inmunoglobulina no modificado (es decir, dAb no modificado), por ejemplo un dAb que se une a una diana, comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) dentro de una estructura de marco. Mientras que en la genética de cadenas de inmunoglobulina naturales la región V termina al comienzo de CDR3, estando el resto de CDR3 proporcionado por las regiones D y J (dando como resultado una fusión V-D-J); para los fines de la presente invención un dAb incluye todo el CDR3 y termina en el resto 4 del marco estructural en su extremo C terminal. Un dAb VH termina en los restos LVTVSS en su extremo C terminal. Un dAb VHH termina en los restos VTVSS en su extremo C terminal. Un dAb VL termina en VEIKR en su extremo C terminal.

Un "dAb modificado" es un dAb tal como se describe en el presente documento que adicionalmente tiene una modificación que altera la conformación tridimensional del extremo C terminal del dAb. Un dAb modificado incluye un dAb que comprende adiciones, extensiones o etiquetas C terminales y/o determinadas sustituciones de aminoácidos como se divulgan en el presente documento.

La divulgación también proporciona un dAb modificado tal como se describe en el presente documento que tiene unión reducida a ADA y que tiene unión reducida a ADA tal como se determina usando un ensayo de confirmación tal como se describe en el ejemplo 2 y en el que dicho dAb tiene un % medio de inhibición de la señal que es menos del 90 %, por ejemplo menos del 80 %, por ejemplo menos del 70 %, por ejemplo menos del 60 %, por ejemplo menos del 50 %, por ejemplo menos del 40 %, por ejemplo menos del 30 %, por ejemplo menos del 20 %, por ejemplo menos del 10 %, en comparación con el dAb control que tiene aproximadamente el 98 %-100 % de inhibición de la señal, teniendo dicho dAb control (no modificado) la misma o similar secuencia pero no está modificado para reducir la unión a ADA.

Un ADA preexistente es un ADA ya presente en el sujeto al que se va a administrar el fármaco. Un ADA preexistente puede estar presente en un sujeto sin tratamiento previo (es decir, un sujeto al que nunca se le ha administrado el fármaco antes).

Un "dominio" es una estructura proteica plegada que tiene estructura terciaria independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas y, en muchos casos, se pueden añadir, eliminar o transferir a otras proteínas sin que se pierda la función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable de anticuerpo único" es un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de los dominios variables del anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables completos del anticuerpo y dominios variables modificados en los que, por ejemplo, uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables del anticuerpo, o dominios variables del anticuerpo que se han truncado o que comprenden extensiones en los extremos N o C terminales, así como fragmentos plegados de los dominios variables que conservan al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

Tal como se usa en el presente documento, el término "dosis" se refiere a la cantidad de fusión o conjugado administrada a un sujeto toda a la vez (dosis unidad) o en dos o más administraciones durante un intervalo de tiempo definido. Por ejemplo, dosis puede referirse a la cantidad de fusión o conjugado administrada a un sujeto durante el curso de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas o uno o

varios meses (por ejemplo, mediante una administración única o mediante dos o más administraciones). El intervalo entre dosis puede ser cualquier periodo de tiempo deseado.

“Monovalente” significa unión a un epítipo.

5 La expresión “semivida” se refiere al tiempo que precisa la concentración en plasma o suero de la fusión o conjugado para reducirse al 50 %, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación y/o eliminación o secuestro mediante mecanismos naturales. Las composiciones de la invención se estabilizan *in vivo* y su semivida aumenta mediante la unión a moléculas de albúmina en suero, por ejemplo albúmina de suero humano (HSA) que resiste la degradación y/o eliminación o secuestro. Estas moléculas de albúmina de suero son proteínas naturales que tienen por sí mismas una semivida larga *in vivo*. La semivida de una molécula aumenta si persiste su actividad funcional *in vivo* durante un periodo más largo que una molécula similar que no es específica para la molécula que aumenta su semivida.

10 Tal como se usa en el presente documento, “tamaño hidrodinámico” se refiere al tamaño aparente de una molécula (por ejemplo una molécula de proteína, ligando) basado en la difusión de la molécula a través de una solución acuosa. La difusión o movimiento de una proteína a través de una solución puede procesarse para derivar un tamaño aparente de la proteína, en el que el tamaño se da mediante el “radio de Stoke” o “radio hidrodinámico” de la partícula proteica. El “tamaño hidrodinámico” de una proteína depende de la masa y de la forma (conformación), de tal modo que dos proteínas que tienen la misma masa molecular pueden tener diferentes tamaños hidrodinámicos sobre la base de la conformación total de la proteína.

15 Los cálculos de “homología” o de “identidad” “o similaridad” entre dos secuencias (los términos se usan en el presente documento intercambiamente) se llevan a cabo como sigue. Las secuencias están alineadas con propósitos de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo y secuencias no homólogas pueden no tomarse en cuenta para propósitos de comparación). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada con propósitos de comparación es al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Los restos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes o en las posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o por el mismo nucleótido según la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en el presente documento “homología” de aminoácidos o de ácidos nucleicos es equivalente a “identidad” de aminoácidos o de ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesita introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Los alineamientos de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos y la homología, similaridad o identidad, tal como se definen en el presente documento pueden prepararse y determinarse usando el algoritmo BLAST 2 Sequences, usando parámetros por defecto (Tatusova, T. A. y col *FEMS Microbiol Lett*, 174:187-188 (1999)).

20 La invención se refiere a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican las composiciones de la invención que se describen en el presente documento.

40 Los ácidos nucleicos denominados en el presente documento como “aislados” son ácidos nucleicos que se han separado de otro material (por ejemplo, otros ácidos nucleicos tales como ADN genómico, ADNc y/o ARN) en su ambiente original (por ejemplo, en células o en una mezcla de ácidos nucleicos tal como una biblioteca). Un ácido nucleico aislado puede estar aislado como parte de un vector (por ejemplo, un plásmido).

45 Los ácidos nucleicos que se denominan en el presente documento “recombinantes” son ácidos nucleicos que se han producido mediante metodología de ADN recombinante, incluidos procedimientos que se basan en recombinación artificial, tales como clonación en un vector o cromosoma usando, por ejemplo, enzimas de restricción, recombinación homóloga, virus y similares, y ácidos nucleicos preparados usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

50 La invención también se refiere a una célula huésped recombinante, por ejemplo de mamífero o microbiana, que comprende un (uno o varios) ácido nucleico recombinante o constructo de expresión que comprende ácido(s) nucleico(s) que codifican una composición de la invención tal como se describe en el presente documento. También se proporciona mediante la divulgación un procedimiento de preparación de una composición de la invención tal como se describe en el presente documento, que comprende retener una célula recombinante, por ejemplo una célula de mamífero o microbiana, de la invención en condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido de fusión. El procedimiento puede comprender además la etapa de aislar o recuperar la fusión, si se desea.

55 Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (es decir, una o varias moléculas de ácidos nucleicos) que codifican una molécula de la invención pueden introducirse en una célula huésped adecuada para crear una célula huésped recombinante usando cualquier procedimiento apropiado para la célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), de tal modo que la(s) molécula(s) de ácido nucleico se enlazan operativamente a uno o más elementos de control de la expresión (por ejemplo, en un vector, en un constructo creado por procedimientos en la célula, integrado en el genoma de la célula huésped). La célula huésped recombinante resultante puede mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo en presencia de un inductor, en un animal adecuado, en medios de cultivo adecuados suplementados con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), por lo que se produce el péptido o polipéptido codificado. Si se desea, el péptido o polipéptido codificado puede aislarse o recuperarse (por ejemplo, a partir de un animal, la célula huésped, un medio, leche). El proceso abarca la expresión en una célula huésped de un animal transgénico (véase, por ejemplo, el documento WO 92/03918, GenPharm International).

Las moléculas de la invención tal como se describen en el presente documento también pueden producirse en un sistema de expresión *in vitro*, por ejemplo mediante síntesis química o mediante cualquier otro procedimiento adecuado.

5 Tal como se describe y se ejemplifica en el presente documento, las moléculas de la invención se unen generalmente a sus ligandos diana con una afinidad alta.

10 Las moléculas de la invención pueden expresarse en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*). En una realización, el dAb se segrega en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*); o en cultivo celular de mamífero (por ejemplo CHO o células HEK 293). Aunque las moléculas descritas en el presente documento pueden ser secretables cuando se expresan en *E. coli* o en especies de *Pichia* o células de mamífero, pueden producirse usando cualquier procedimiento adecuado tal como procedimientos químicos de síntesis o procedimientos de producción biológicos que no usan *E. coli* o especies de *Pichia*. En una realización, el ácido nucleico que codifica los dAb de la invención, por ejemplo los dAb TNFR1 descritos en el presente documento, pueden clonarse dando un vector de expresión adecuado, por ejemplo. Pave011 (de Fujifilm Diosynth) y después expresarse en un vector microbiano tal como *E. coli*.

15 En una realización, la divulgación también proporciona una molécula, por ejemplo, dAb (tal como un VH o VL o un VHH) que comprende un marco estructural modificado que reduce la unión a ADA preexistente, por ejemplo un dAb (tal como un VHH, VH o VL) que comprende una sustitución de aminoácidos en una cualquiera de las posiciones 14, 41, 108, 110 ó 112. Por ejemplo, estas sustituciones pueden seleccionarse entre: P14A, P14K, P14Q, P14T, P41A, L108A, L108 Q, T110A y S112A.

20 En un aspecto de esta realización el dAb (por ejemplo el VHH, VH o VL) comprende una o varias modificaciones seleccionadas entre: P14A, P14K, P14Q, P14T, P41A, L108A, T110A y S112A; y pueden comprender adicionalmente cualquiera de las extensiones, adiciones, deleciones o etiquetas en el extremo C terminal tal como se han descrito anteriormente.

25 En una realización el dAb (por ejemplo el VHH, VH o VL) comprende una o varias modificaciones seleccionadas entre: P14A, P14K, P14Q, P14T P41A, L108A, T110A y S112A y también comprende una extensión de aminoácidos en el extremo C terminal del dAb que se selecciona entre: (a) alanina o (b) una secuencia de aminoácidos que comprende o consta de una extensión selecciona entre: AS, AST, ASTK, ASTKG o ASTKGP. Adicionalmente, las moléculas de dAb descritas en el presente documento y las composiciones farmacéuticas que comprenden estas moléculas pueden ser útiles en la prevención o reducción de efectos secundarios. La unión de anticuerpos anti-fármaco por un dAb puede dar como resultado que dos dAb se pongan en contacto. En algunas circunstancias, esto puede dar como resultado preocupaciones en la seguridad. Por ejemplo, si la diana de un dAb es un receptor o una diana polimérica, con la puesta en contacto de dos dAb pueden obtenerse dos dianas juntas. Esto puede provocar efectos farmacológicos no esperados, por ejemplo agonismo más que antagonismo, por ejemplo mediante la dimerización del receptor. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona el uso de las moléculas de la invención en la prevención de efectos secundarios. Por prevención se pretende decir que el uso de las moléculas de la invención invalida a un nivel total o parcial la unión de anticuerpo anti-fármaco preexistentes en comparación con la molécula equivalente que no ha sido modificada. La reducción en la unión de ADA provoca una reducción en el nivel de efectos farmacológicos no deseados. Por lo tanto, las moléculas de la invención pueden tener un perfil de seguridad potenciado y menos efectos secundarios que las moléculas no modificadas, por ejemplo dAb no modificados, que no comprenden una extensión de C terminal para reducir la unión a ADA preexistente. De forma similar, la administración de las moléculas modificadas descritas en el presente documento o de composiciones farmacéuticas que comprenden estas moléculas modificadas (que tienen capacidad reducida para unirse a ADA preexistente) puede dar como resultado inmunogenicidad modificada; esto es debido a que cuando las moléculas no modificadas se unen a ADA forman complejos inmunitarios y dichos complejos inmunitarios podrían generar después una respuesta inmunitaria. Además, la administración de las moléculas modificadas descritas en el presente documento o de composiciones farmacéuticas que comprende estas moléculas modificadas puede dar como resultado también una eficacia mejorada y un perfil de seguridad mejorado y, por ejemplo, puede usarse ventajosamente para la dosificación repetida a pacientes que podrían desarrollar autoanticuerpos a las moléculas modificadas. Además, las moléculas de dAb de la invención se pueden administrar a una población de pacientes sin la necesidad de realizar análisis previos de valoración de ADA para eliminar sujetos con riesgo de una reacción adversa.

35 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para prevenir o reducir efectos secundarios en un régimen de tratamiento mediante la administración de las moléculas de la invención. También se proporciona mediante la divulgación un procedimiento para modificar una molécula tal como se ha descrito en el presente documento para reducir su unión a ADA y para reducir efectos secundarios.

40 La invención también proporciona composiciones que comprende las moléculas modificadas. Dichas composiciones pueden comprender las moléculas modificadas presentes en forma de fusión o conjugado con otras moléculas, por ejemplo otras proteínas, moléculas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, un dAb puede estar presente en forma de un dAb al que se ha dado formato (por ejemplo, el dAb puede estar presente en forma de una fusión o conjugado dAb-Fc tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/149148) o puede estar presente en forma de un mAbdAb (tal como se describe en el documento WO 2009/068649) o el dAb está presente en forma de una fusión o conjugado con proteínas o polipéptidos que prolongan la semivida, por ejemplo otro dAb, por ejemplo, un dAb que se une a albúmina de suero (AlbudAb™) o, por ejemplo, con polietilenglicol PEG u otras moléculas terapéuticas o activas. En esta realización la(s) molécula(s) terapéutica(s) cuando están presentes en forma de una fusión o conjugado con un dAb pueden unirse tanto a la extensión C terminal del dAb o al extremo N terminal del dAb. En una realización una o varias moléculas terapéuticas están presentes en forma de una fusión (o conjugado) en el extremo N terminal del dAb.

65 En una realización de la divulgación, los dAb (y también moléculas que comprenden dAb tales como mAbdAb) que tienen capacidad reducida para unirse a ADA se unen a un ligando diana con afinidad alta, por ejemplo pueden tener

una KD medida por resonancia de plasmón superficial usando Biacore <sup>TM</sup> en la región de 5 micromolar a aproximadamente 1 pM, por ejemplo de 500 nM a aproximadamente 10 pM, por ejemplo de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 10 pM, por ejemplo de 50 nM a aproximadamente 10 pM, por ejemplo de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 10 pM. En una realización la molécula puede tener una KD de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10-30 pM, por ejemplo puede ser un dAb TNFR1 con unión reducida a ADA y que tienen una KD de aproximadamente 10-30 pM, por ejemplo de aproximadamente 20 pM.

En una realización los dAb de la divulgación (y también moléculas que comprenden dAb tales como mAbdAb) que tienen capacidad de unión reducida a ADA pueden tener niveles de expresión que son al menos el 3 %, por ejemplo el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de los mostrados por un dAb de la misma secuencia o una similar de aminoácidos que no está modificado tal como se ha descrito en el presente documento para reducir su unión a ADA. En otra realización las moléculas de la invención (por ejemplo, dAb y moléculas que comprende dAb tales como mAbdAb) que tienen capacidad reducida para unirse a ADA pueden tener niveles de expresión de al menos 0,1 g/litro.

En una realización, los dAb de la divulgación (y también moléculas que comprenden dAb tales como mAbdAb que también son parte de la invención) que tienen una capacidad reducida de unión a ADA tienen una KD de unión a su antígeno diana que es aproximadamente 50 veces superior (o más) (es decir, los dAb son 50 veces menos potentes), por ejemplo 40 veces superior, aproximadamente 30 veces superior, aproximadamente 20 veces superior, aproximadamente 10 veces superior, aproximadamente 5 veces superior, aproximadamente 4 veces superior que la KD de un dAb de la misma secuencia o una similar de aminoácidos que no está modificado tal como se describe en el presente documento para reducir su unión a ADA. En una realización los dAb de la divulgación (y también moléculas que comprenden dAb tales como mAbdAb) que tienen una capacidad reducida para unirse a ADA tienen una KD para su antígeno diana que es esencialmente la misma ( es decir, alrededor de 2 veces superior a 2 veces inferior) o más de 2 veces inferior que la KD de un dAb de la misma secuencia o una similar de aminoácidos que no está modifica tal como se describe en el presente documento para reducir su unión a ADA.

La invención también se refiere a usos, formulaciones, composiciones que comprenden tales moléculas extendidas y/o modificadas en su extremo C y también a procedimientos de producción y expresión de estas moléculas.

En otra realización la divulgación proporciona un dAb modificado que se describe o divulga en uno cualquiera de los documentos WO 2007/049017, WO 2008/149144 y WO 2008/149148 (por ejemplo una cualquiera de las secuencias de dAb descritos anteriormente), y que el dAb se modifica después para comprender una o varias modificaciones estructurales, por ejemplo seleccionadas entre: mutaciones estructurales P14A, P14K, P14Q, P14T P41A, L108A, T110A y S112A y que también, adicionalmente, puede comprender opcionalmente cualquiera de las modificaciones C terminales descritas en el presente documento. En un ejemplo el dAb no modificado puede ser una cualquiera de las secuencias de dAb anti-TNFR1 descritas o divulgadas en uno cualquiera de los documentos WO 2007/049017, WO 2008/149144 y WO 2008/149148. En una realización la secuencia de dAb anti-TNFR1 puede ser una que sea al menos el 80 % (por ejemplo el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %) idéntica a la secuencia de dAb identificada como DOM1h-131-206 (divulgada en el documento WO 2008/149148), DOM 1h-131-511 (divulgada en los documentos WO 2007/049017 y 2008/149144) y DOM 1h-131-202 (divulgada en el documento WO 2008/149144).

Las secuencias de aminoácidos de dAb no modificado son como sigue:

(a) DOM 1H-131-206

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETM VVWRQAPGKGLEWVSHIPDPGQDPFYADSVKGR  
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLLTVSS

(SEC ID N° 1)

(b) DOM

1H-131-511

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETM VVWRQAPGKGLEWVSHIPDPGQDPFYADSVKGRFTI  
SRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLLTVSS

(SEC ID N° 2)

(c) DOM

1H-131-202

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETM VVWRQAPGKGLEWVSHIPDPGQDPFYADSVKGRFTI  
SRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLLTVSS

(SEC ID N° 3)

(d) Clon de VHH 2(d):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISR  
DNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL  
VQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS

(SEC ID N° 4)

(e) Clon de VHH 2(e):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVWRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTI

SRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRRGGTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPG  
NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL  
RPEDTAVYYCTIGGSLRSSLRSGTGLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY  
WMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGF  
NRGQGTGLVTVSS

5

(SEC ID N° 5)

(f) Clon de VHH 2(f):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTI  
SRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESG  
GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRM  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

10

(SEC ID N° 6)

La divulgación proporciona un dAb VHH seleccionado de las secuencias siguientes:

15

(a) Clon de VHH 2(d) + A:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISR  
DNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGTGLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGL  
VQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQ  
MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSLRSGTGLVTVSSA

20

(SEC ID N° 7)

(b) Clon de VHH 2(e) + A:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTI  
SRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRRGGTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPG  
NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL  
RPEDTAVYYCTIGGSLRSSLRSGTGLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY  
WMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGF  
NRGQGTGLVTVSSA

25

(SEC ID N° 8)

(c) Clon de VHH 2(f) + A:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTI  
SRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESG  
GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRM  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSA

30

(SEC ID N° 9)

35 La invención proporciona un dAb DOM1h-131-206 modificado que se une a TNFR1 y que está seleccionado de la secuencia de aminoácidos siguiente:

(a) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGDQDPFYADSVKGRFTI  
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTGLVTVSSA

40

(SEC ID N° 16)

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención descritas en el presente documento, por ejemplo ácidos nucleicos que codifican los dAb anti-TNFR1 descritos anteriormente. También se proporciona células huésped, por ejemplo células huésped no embrionarias, por ejemplo células huésped procariontas o eucariotas tales como células huésped de E. coli o de levadura que comprenden estos ácidos nucleicos.

45

El experto apreciará que, después de la producción de una molécula tal como se ha descrito en el presente documento, por ejemplo un dAb, en particular dependiendo de la línea celular usada y en particular de la secuencia de aminoácidos particular de la molécula, por ejemplo dAb, pueden tener lugar modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, esto puede incluir la escisión de determinadas secuencias líder, la adición de diversos restos de azúcar en diversos patrones de glucosilación y fosforilación, desamidación, oxidación, mezclado de enlace disulfuro, isomerización, eliminación de lisina del extremo C, y ciclación de glutamina en el extremo N terminal. La presente invención abarca el uso de las moléculas, por ejemplo dAb, que se han sometido a, o han experimentado, una o varias modificaciones postraduccionales. De este modo un dAb de la invención incluye un dAb que ha experimentado una modificación postraducciona tal como se describe a continuación: Se sabe que la glucosilación de anticuerpos en posiciones conservadas de sus regiones constantes tiene un efecto profundo sobre la función del anticuerpo, en particular el funcionamiento efector; véase, por ejemplo, Boyd y col. (1996) Mol. Immunol. 32: 1311-

50

55

1318. Se contemplan variantes de glucosilación de las proteínas de unión a antígeno de la invención en las que se añaden, se sustituyen, se eliminan o se modifican uno o varios restos carbohidrato. La introducción de un motivo de asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un posible sitio de unión enzimática de los restos carbohidratos y, por tanto, pueden usarse para manipular la glucosilación de un anticuerpo. En Raju y col. (2001) *Biochemistry* 40: 8868-8876 la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se incrementó mediante un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3 sialiltransferasa. Se cree que el incremento de la sialilación terminal aumenta la semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las glucoproteínas, normalmente se producen como una mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente de mamífero. Se han desarrollado diversos procedimientos para fabricar glucoformas definidas, véase Zhang y col. (2004) *Science* 303: 371; Sears y col. (2001) *Science* 291: 2344; Wacker y col. (2002) *Science* 298: 1790; Davis y col. (2002) *Chem. Rev.* 102: 579; Hang y col. (2001) *Acc. Chem. Res* 34: 727. Los anticuerpos (por ejemplo de los isotipos de IgG, por ejemplo IgG1) tal como se describen en el presente documento pueden comprender un número definido (por ejemplo 7 o menos, por ejemplo 5 o menos, tal como dos o solo uno) de glucoforma(s). La desamidación es una reacción enzimática que convierte primeramente asparagina (N) en ácido isoaspártico y ácido aspártico (D) en una relación de aproximadamente 3:1. En un grado muy inferior, la desaminación puede tener lugar con restos de glutamina de un modo similar. La desaminación en una CDR da como resultado un cambio en la carga de la molécula, pero típicamente no da como resultado un cambio en la unión a antígeno, ni afecta sobre PK/PD; la oxidación puede tener lugar durante la producción y almacenamiento (es decir, en presencia de condiciones oxidantes) y da como resultado una modificación covalente de una proteína, inducida bien directamente mediante especies de oxígeno reactivas o bien indirectamente mediante reacción con subproductos secundarios de estrés oxidativo. La oxidación sucede primeramente con restos de metionina, pero ocasionalmente puede tener lugar en restos de triptofano y cisteína libre; la introducción de enlaces disulfuro puede tener lugar durante la producción y condiciones de almacenamiento básicas. En determinadas circunstancias, los enlaces disulfuro pueden romperse o formarse incorrectamente, dando como resultado restos de cisteína desparejados (-SH). Estos sulfhidrilos (-SH) libres (desparejados) pueden promover un reordenamiento; la isomerización tiene lugar típicamente durante la producción, purificación y almacenamiento (a pH ácido) y generalmente tiene lugar cuando se convierte ácido aspártico e ácido isoaspártico mediante un proceso químico; la glutamina N terminal de la cadena pesada y/o de la cadena ligera es probable que forme piroglutamina (pGlu). La mayor parte de la formación de pGlu sucede en el biorreactor de producción, pero puede formarse de forma no enzimática, dependiendo del pH y la temperatura del procesamiento y las condiciones de almacenamiento. La formación de pGlu se considera como una de las rutas de detragación principales para mAb recombinantes; la eliminación de la lisina del extremo C es una reacción enzimática catalizada por carbopeptidasas y se observa comúnmente en mAb recombinantes. Las variantes de este proceso incluyen la eliminación de lisina de una o ambas cadenas pesadas. La eliminación de lisina no parece que afecte a la bioactividad y no tiene efecto sobre la función efectora del dAb.

La divulgación también proporciona un procedimiento para producir una molécula de la presente invención que comprende una extensión de aminoácidos presente como una fusión directa, comprendiendo el procedimiento mantener una célula huésped tal como las descritas anteriormente que comprende un ácido nucleico y/o constructo recombinante que codifica una fusión de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico recombinante, con lo que se produce una fusión.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas modificadas de la invención. La invención proporciona también una composición farmacéutica de la invención para su uso en terapia, por ejemplo para su uso en el tratamiento o la prevención de, por ejemplo, una enfermedad o afección o trastorno y que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención. Generalmente, las moléculas de la invención se usarán en forma purificada junto con vehículos farmacológica o fisiológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos pueden incluir soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo cualquier solución salina y/o medios tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y Ringer lactato. Los coadyuvantes adecuados fisiológicamente aceptables, si es necesario para mantener un complejo polipeptídico en suspensión, pueden seleccionarse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores fluidos y nutrientes y reforzadores electrolíticos tales como los basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición). Puede usarse una diversidad de formulaciones adecuadas, incluidas las formulaciones de liberación prolongada.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse solas o en combinación con otras moléculas o restos, por ejemplo polipéptidos, proteínas y/o moléculas terapéuticas (por ejemplo, otras proteínas (incluidos anticuerpos), péptidos o fármacos de molécula pequeña).

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden dAb VH para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, por ejemplo psoriasis, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo enfermedad de Crohn y colitis ulcerante); o por ejemplo enfermedades o trastornos respiratorios o pulmonares, por ejemplo seleccionados entre: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, bronquitis obstructiva crónica y enfisema, inflamación pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, neumonía, neumonitis hipersensitiva, infiltrado pulmonar con eosinofilia, enfermedad pulmonar ambiental, neumonía, bronquiectasis, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, tromboembolismo pulmonar, trastornos de la pleura, trastornos del mediastino, trastornos del diafragma, hipoventilación, hiperventilación, apnea del sueño, síndrome de dificultad respiratoria aguda, mesotelioma, sarcoma, rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped, cáncer de pulmón, rinitis alérgica, alergia, asbestosis, aspergiloma, aspergilosis, bronquiectasis, bronquitis crónica, enfisema, neumonía eosinófila, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de neumococos invasiva, gripe, micobacterias no tuberculosas, efusión pleural, neumocitosis, neumocitosis, neumonía, actinomicosis pulmonar, proteinosis pulmonar alveolar, carbunco pulmonar, edema pulmonar, embolia pulmonar, inflamación pulmonar, hictiocitosis pulmonar X,

hipertensión pulmonar, nocardiosis pulmonar, tuberculosis pulmonar, enfermedad venooclusiva pulmonar, enfermedad pulmonar reumatoide, sarcoidosis y granulomatosis de Wegener y lesión pulmonar aguda (LPA) y también síndrome de insuficiencia respiratorio aguda (SIRA) y complicaciones de los mismos tales como lesión renal aguda.

- 5 La invención también se refiere al uso de cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento para su uso en terapia o profilaxis de cualquiera de las enfermedades o trastornos inflamatorios o enfermedades o trastornos respiratorios o pulmonares tal como se han descrito anteriormente.

10 Las composiciones que contienen los dAb anti-TNFR1 tal como se describen en el presente documento, por ejemplo DOM 1H-131-206 con una extensión de alanina C terminal, pueden administrarse para tratamientos profilácticos o terapéuticos y se administran en forma de una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para lograr esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del sistema inmunitario propio del paciente, pero generalmente variarán de 0,005 a 5,0 mg de dAb por kilogramo de peso corporal del paciente, siendo más comúnmente usadas dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, se pueden usar dosificaciones similares o ligeramente inferiores para prevenir, inhibir o retardar la aparición de la enfermedad (por ejemplo, para mantener la remisión o quiescencia, o para prevenir una fase aguda). El médico experto será capaz de determinar el intervalo de dosificación apropiado para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad. Cuando se administra un dAb anti-TNFR1 tal como se ha descrito en el presente documento para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica, puede administrarse hasta cuatro veces al día, dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses, a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg. En realizaciones particulares, el dAb anti-TNFR1 puede administrarse para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica una vez cada dos semanas o una vez al mes a una dosis de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg.)

- 35 El tratamiento o terapia realizada usando las composiciones descritas en el presente documento se considera "eficaz" si se reducen o alivian uno o varios síntomas o signos (por ejemplo, en al menos el 10 % o al menos un punto en la escala de valoración clínica), con relación a dichos síntomas presentes antes del tratamiento o con relación a dichos síntomas en un individuo (ser humano o modelo animal) no tratado con dicha composición u otro control adecuado. Los síntomas dependerán, obviamente, de la naturaleza precisa de la enfermedad o trastorno diana, pero pueden ser medidos por un médico o técnico experto.

De forma similar, la profilaxis realizada usando una composición tal como se describe en el presente documento es "eficaz" si la aparición o la gravedad de uno o varios síntomas o signos se retarda, se reduce o se abole con respecto a dichos síntomas en un individuo similar (ser humano o modelo animal) no tratado con la composición.

- 45 A las moléculas de la invención se les puede dar formato posteriormente para que tengan un tamaño hidrodinámico superior para aumentar adicionalmente la semivida, por ejemplo, uniendo un grupo PEG, albúmina de suero, transferrina, receptor de transferrina o al menos la porción de unión de transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo o mediante conjugación a un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, el dAb que se une a albúmina de suero puede dársele formato en forma de un fragmento de unión a antígeno más grande de un anticuerpo (por ejemplo, darle formato en forma de Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, IgG, scFv).

- 50 En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona una composición según la invención que comprende un ligando con especificidad dual o un ligando con especificidad múltiple que comprende un primer dAb que está modificado según la invención, por ejemplo mediante una extensión C terminal y/o mediante una mutación de marco estructural P14A y un segundo dAb que tiene la misma especificidad de unión o una diferente que el primer dAb y opcionalmente en el caso de ligandos multiespecíficos otros dAb. El segundo dAb (u otros dAb) pueden unirse opcionalmente a una diana diferente y también pueden comprender opcionalmente una extensión en el extremo C y/o una mutación estructural P14A según la invención.

- 60 En un aspecto, la invención proporciona las moléculas y composiciones de la invención para su administración mediante administración parenteral, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, inhalación, administración nasal, administración transmucosal, administración al tracto GI de un paciente, administración rectal o administración ocular. En un aspecto, la invención proporciona el uso de las moléculas y composiciones de la invención en la fabricación de un medicamento para administrar mediante inyección subcutánea, inhalación, administración intravenosa, administración nasal, administración transmucosal, administración oral, administración al tracto GI del paciente, administración rectal, administración transdérmica u ocular.

- 65 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para administrar a un paciente mediante inyección subcutánea, administración pulmonar, administración intravenosa, administración nasal, administración transmucosal, administración oral, administración al tracto GI de un paciente, administración rectal u ocular, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una molécula de

la invención.

En un aspecto, la divulgación proporciona una formulación oral, inyectable, inhalable, nebulizable que comprende una molécula de la invención.

La formulación puede ser en forma de un comprimido, píldora, cápsula, líquido o sirope.

- 5 El término "sujeto" o "individuo" tal como se define en el presente documento incluye animales tales como mamíferos, incluidos, pero sin limitarse a, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies de bovinos, ovinos, equinos, cánidos, felinos, roedores o murinos.

- 10 La divulgación también proporciona un kit para su uso en la administración de moléculas y composiciones según la invención a un sujeto (por ejemplo un paciente humano) que comprende una molécula o composición de la invención, un dispositivo de administración del fármaco y, opcionalmente, instrucciones de uso. La composición puede proporcionarse en forma de formulación, tal como una formulación liofilizada o una formulación de liberación lenta. En determinadas realizaciones, el dispositivo de administración del fármaco se selecciona del grupo  
15 constituido por una jeringa, un inhalador, un dispositivo de administración intranasal u ocular (por ejemplo un nebulizador, un gotero ocular o nasal) y un dispositivo de inyección sin aguja.

- Las moléculas y composiciones de la invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su uso. Puede usarse cualquier procedimiento de liofilización adecuado (por ejemplo, secado por pulverización, secado de torta) y/o técnico de reconstitución. Se apreciará por parte de los expertos en la técnica que la liofilización y reconstitución puede dar como resultado diversos grados de pérdida de actividad del anticuerpo y que se pueden tener que ajustar niveles de uso para compensar. En una realización particular, la divulgación proporciona una composición que comprende una composición liofilizada tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, la composición liofilizada no pierde más de aproximadamente el 20 %, o más de aproximadamente el 25 %, o más de aproximadamente el 30 %, o más de aproximadamente el 35 %, o más de aproximadamente el 40 %, o más de aproximadamente el 45 %, o más de aproximadamente el 50 % de su actividad (por ejemplo, su actividad de unión a albúmina de suero) cuando se rehidrata. La actividad es la cantidad de composición requerida para producir el efecto de la composición antes de que fuera liofilizada. La actividad de la composición puede determinarse usando cualquier procedimiento adecuado antes de la liofilización y la actividad puede determinarse usando el mismo procedimiento después de la rehidratación para determinar la cantidad de actividad perdida.

- 30 La divulgación también proporciona formulaciones de liberación mantenida o lenta que comprenden las moléculas de la invención, pudiendo comprender dichas formulaciones de liberación mantenida las moléculas de la invención en combinación con, por ejemplo, ácido hialurónico, microesferas o liposomas y otros vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéuticos o farmacológicamente aceptables.

- 35 En un aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de la invención y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticos o farmacológicamente aceptables.

- La invención proporciona el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16), por ejemplo en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo para su uso para tratar una enfermedad o trastorno, por ejemplo para tratar una enfermedad o trastorno respiratorio tal como COPD, LPA o ARDS. El dAb DOM1h-131-206 dAb con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16) (o composición farmacéutica que comprende el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal) cuando se usa para tratar una enfermedad o trastorno respiratorio tal como COPD, LPA o ARDS puede administrarse a un sujeto, por ejemplo a un sujeto humano, mediante inyección (por ejemplo mediante inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular) o alternativamente puede administrarse al sujeto, por ejemplo un sujeto humano, mediante administración pulmonar, por ejemplo mediante nebulización usando un nebulizador estándar o mediante inhalación, por ejemplo usando un dispositivo inhalador estándar. La divulgación también proporciona formulaciones de liberación mantenida y/o liofilizadas que comprenden los dAb TNFR1 modificados de la presente invención con unión a ADA reducida, tales como el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16). También se proporciona un dispositivo de administración, por ejemplo un dispositivo inhalador o nebulizador que comprende los dAb TNFR1 modificados de la presente invención, tal como el dAb DOM1h-131-206 con una extensión de una única alanina en el ácido nucleico del extremo C terminal (SEC ID N° 16).

- 55 En un aspecto la invención proporciona el DOM1h-131-206 dAb con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16), para tratar un trastorno de la piel inflamatorio, por ejemplo psoriasis y se proporciona también mediante la divulgación uno cualquiera de los regímenes de dosificación tal como se han descrito anteriormente para el uso de un anticuerpo de dominio en el tratamiento de la psoriasis. El anticuerpo de dominio puede proporcionarse en una vial que contiene 100 mg o por ejemplo 40 mg de un liofilizado del anticuerpo de dominio. El liofilizado puede comprender sacarosa, glicina, dihidrogenofosfato de sodio y polisorbato 80. Este anticuerpo de dominio liofilizado puede reconstituirse inicialmente en 5 ml de agua estéril y después diluirse con agua estéril u otro diluyente farmacéuticamente aceptable para fabricar composiciones farmacéuticas que comprenden 20 mg/ml, 5 mg/ml y 1 mg/ml del anticuerpo de dominio.

- 60 El anticuerpo de dominio puede usarse para tratar pacientes humanos que tengan psoriasis. En particular, el anticuerpo de dominio puede usarse para tratar pacientes humanos que se ha identificado que tienen psoriasis tipo placa crónica moderada leve o grave estable con una o dos áreas de placa. Según la Fundación Nacional de Psoriasis de Estados Unidos, la psoriasis tipo placa leve afecta a menos del 3 % de un área superficial del cuerpo del paciente humano, la psoriasis tipo placa moderada afecta a entre el 3 % y el 10 % del área superficial del paciente humano y la psoriasis grave afecta a más del 10 por ciento del área superficial del cuerpo del paciente.

Véase, por ejemplo Krajacic, 6 (5) Supplement 6, Biotechnology Healthcare, diciembre de 2009 y Fundación Nacional de Psoriasis, About Psoriasis: Estadísticas Como punto de referencia, una palma de la mano de un paciente humano podría considerarse aproximadamente como el 1 % del área superficial del cuerpo del paciente. La gravedad de la psoriasis también puede determinarse, como alternativa, según el área de psoriasis y el índice de gravedad mediante el uso del sistema de graduación descrito por Fredrikson que se basa en cuatro criterios: enrojecimiento, espesor, escamado y la cantidad de área superficial implicada. Véase, por ejemplo, Fredrickson, 157 Dermatologica 238 (1978). Las placas psoriáticas que se van a tratar pueden tener un espesor infiltrado comparable de al menos 200  $\mu\text{m}$ , evaluado mediante medidas sonográficas, cuando el anticuerpo de dominio se administra por primera vez. Los pacientes humanos pueden ser sujetos masculinos o femenidos que tienen psoriasis tipo placa con placa(s) estable(s) en las extremidades superiores, muslos o tronco. Estos pacientes humanos pueden tener de aproximadamente 18 a aproximadamente 70 años de edad. Los pacientes humanos también pueden tener de 14 a 26 años de edad así como 14 o más años de edad.

El anticuerpo de dominio puede administrarse a estos pacientes humanos mediante inyección en la placa psoriática. En particular, pueden administrarse 100  $\mu\text{l}$  de una composición farmacéutica que comprende 20 mg/ml, 5 mg/ml o 1 mg/ml del anticuerpo de dominio mediante inyección en la placa psoriática a una profundidad que se dirige a la epidermis y a la dermis superficial de la placa.

El anticuerpo de dominio puede administrarse a un paciente humano con una placa psoriática según un protocolo de tratamiento en el que se inyectan en una placa psoriática 100  $\mu\text{l}$  de una composición farmacéutica que comprende 5 mg/ml de un anticuerpo de dominio una vez a la semana durante un periodo de tratamiento de 28 días. En dicho protocolo de tratamiento, se administrará al paciente la composición farmacéutica cuatro veces y recibirá 0,5 mg del anticuerpo de dominio durante cada administración de modo que se reciba una dosis total de 2 mg del anticuerpo de dominio durante el periodo de tratamiento de 28 días. Esto significa, por ejemplo, que en un protocolo de tratamiento que abarca 28 días el paciente recibiría la primera inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 0,5 mg del anticuerpo de dominio el día uno, la segunda de dichas inyecciones el día ocho, la tercera de dichas inyecciones el día quince y la cuarta de dichas inyecciones el día veintidos. Las dosis de anticuerpo de dominio (por ejemplo, inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 0,5 mg del anticuerpo de dominio) en este protocolo de tratamiento se administran sobre una base de un mg por paciente.

El anticuerpo de dominio puede administrarse también a un paciente humano con una placa psoriática según un protocolo de tratamiento en el que se inyectan en una placa psoriática 100  $\mu\text{l}$  de una composición farmacéutica que comprende 20 mg/ml de un anticuerpo de dominio una vez a la semana durante un periodo de tratamiento de 28 días. En dicho protocolo de tratamiento, se administrará al paciente la composición farmacéutica cuatro veces y recibirá 2 mg del anticuerpo de dominio durante cada administración de modo que se reciba una dosis total de 8 mg del anticuerpo de dominio durante el periodo de tratamiento de 28 días. Esto significa, por ejemplo, que en un protocolo de tratamiento que abarca 28 días el paciente recibiría la primera inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 2 mg del anticuerpo de dominio el día uno, la segunda de dichas inyecciones el día ocho, la tercera de dichas inyecciones el día quince y la cuarta de dichas inyecciones el día veintidos. Las dosis de anticuerpo de dominio (por ejemplo, inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 2 mg del anticuerpo de dominio) en este protocolo de tratamiento se administran sobre una base de un mg por paciente.

El anticuerpo de dominio puede administrarse también a un paciente humano con una placa psoriática según un protocolo de tratamiento en el que se inyectan en una placa psoriática 100  $\mu\text{l}$  de una composición farmacéutica que comprende 5 mg/ml de un anticuerpo de dominio dos veces a la semana durante un periodo de tratamiento de 28 días. En dicho protocolo de tratamiento, se administrará al paciente la composición farmacéutica cuatro veces y recibirá 0,5 mg del anticuerpo de dominio durante cada administración de modo que se reciba una dosis total de 4 mg del anticuerpo de dominio durante el periodo de tratamiento de 28 días. Esto significa, por ejemplo, que en un protocolo de tratamiento que abarca 28 días el paciente recibiría la primera inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 0,5 mg del anticuerpo de dominio el día uno, la segunda de dichas inyecciones el día cuatro, la tercera de dichas inyecciones el día ocho, la cuarta de dichas inyecciones el día once, la quinta de dichas inyecciones el día quince, la sexta de dichas inyecciones el día dieciocho, la séptima de dichas inyecciones el día veintidos y la octava de dichas inyecciones el día veinticinco. Las dosis de anticuerpo de dominio (por ejemplo, inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 0,5 mg del anticuerpo de dominio) en este protocolo de tratamiento se administran sobre una base de un mg por paciente.

El anticuerpo de dominio puede administrarse también a un paciente humano con una placa psoriática según un protocolo de tratamiento en el que se inyectan en una placa psoriática 100  $\mu\text{l}$  de una composición farmacéutica que comprende 1 mg/ml de un anticuerpo de dominio una vez a la semana durante un periodo de tratamiento de 28 días. En dicho protocolo de tratamiento, se administrará al paciente la composición farmacéutica cuatro veces y recibirá 0,1 mg del anticuerpo de dominio durante cada administración de modo que se reciba una dosis total de 0,4 mg del anticuerpo de dominio durante el periodo de tratamiento de 28 días. Esto significa, por ejemplo, que en un protocolo de tratamiento que abarca 28 días el paciente recibiría la primera inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 0,1 mg del anticuerpo de dominio el día uno, la segunda de dichas inyecciones el día ocho, la tercera de dichas inyecciones el día quince y la cuarta de dichas inyecciones el día veintidos. Las dosis de anticuerpo de dominio (por ejemplo, inyección de 100  $\mu\text{l}$  que contiene 0,1 mg del anticuerpo de dominio) en este protocolo de tratamiento se administran sobre una base de un mg por paciente.

El documento WO 2008/149148 describe procedimientos de análisis, aislamiento y producción de dAb DOM1h-131-206 no modificado y dichos procedimientos son aplicables a dAb TNFR1 modificados de la presente invención con unión reducida a ADA, por ejemplo al dAb DOM1h-131-206 con una extensión de solo una alanina en el extremo C terminal (SEC ID N° 16), y esta divulgación (incluidos procedimientos de análisis, aislamiento y producción) se incorporan al presente documento.

#### **EJEMPLOS:**

**Ejemplo 1: Frecuencia de sujetos sanos con ADA preexistente con el dAb denominado DOM1H-131-206**Procedimientos de ensayo de ADA de DOM1H-131-206 (VH)

El DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) se biotinila a una relación de exposición molar a biotina de 8:1. Después del marcado, el DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) biotinilado se intercambia el tampón y se almacena en un tampón de formulación que contiene fosfato de sodio 14 mM, sacarosa al 8,4 %, glicina al 0,35 %, polisorbato 80 al 0,014 % a pH 7,4.

El DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) se biotinila a una relación de exposición molar a biotina de 5:1. Después del marcado, al DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) biotinilado se le intercambia el tampón y se almacena en un tampón de formulación que contiene fosfato de sodio 14 mM, sacarosa al 8,4 %, glicina al 0,35 %, polisorbato 80 al 0,014 % a pH 7,4.

El ensayo de anticuerpo antifármaco (ADA) es un ensayo puente realizado en una plataforma de tecnología ECL (electroquimioluminiscencia) MSD™. La tecnología MSD™ (disponible de Meso scale Discovery, Matyland, Estados Unidos) usa un quelato metálico de rutenio como marca ECL junto con electrodos de carbono situados entre los pocillos de una placa de microvaloración que está recubierta con estreptavidina. El Sulfo-Tag™ unido usado en el ensayo produce una señal de quimioluminiscencia que se desencadena cuando el voltaje se aplica por el instrumento (Meso Scale Discovery Sector™ Imager 6000). La señal de luminiscencia resultante se mide en unidades ECL™. La intensidad de la señal es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos detectados en la muestra. Las muestras de control (QC) negativa (suero humano normal; NHS) y positiva (PC; anticuerpo idiotípico anti-DOM1H-131-206 murino enriquecido en suero humano normal) se llevan a cabo en cada placa de ensayo.

El resumen del procedimiento de ensayo se describe a continuación:

1. Una placa MSD™ con estreptavidina se bloquea con 150 µl/pocillo de caseína bloqueante en PBS (al 1 %) a temperatura ambiente (TA) durante 1-2 horas. El bloqueante se elimina sin lavar.
2. Después de 1 hora de preincubación, una mezcla homogénea que contiene 0,1 µg/ml de DOM1H-131-206 biotinilado (fármaco), 0,1 µg/ml de DOM1H-131-206 rutenilado ("Sulfo-Tag"™) (fármaco) y muestra en suero al 2 % en diluyente de ensayo (1 % de caseína en PBS) se transfiere a la placa MSD™ y se incuba durante 1 hora ± 5 minutos a TA.
3. La placa MSD se lava después 3 veces con PBST.
4. Se añaden 150 µl/pocillo de tampón de lectura y la placa se lee.

Durante la validación de este inmunoensayo específico, se analizó un panel de muestras de suero de 60 donantes humanos sanos para determinar la reactividad de fondo en el ensayo. Se determinó que aproximadamente el 45 % de muestras de suero de estos sujetos tenían autoanticuerpos reactivos con VH detectables, la mayor parte de los isotopos IgG, que son capaces de unirse a DOM1H-131-206 (los resultados se muestran en la figura 1).

El DOM1H-131-206 no marcado libre compite por la unión a ADA en este ensayo dando como resultado una intensidad de señal reducida (% alto de inhibición de la señal). Este "ensayo de confirmación" se usó para determinar si las versiones modificadas de DOM1H-131-206 y otras moléculas basadas en anticuerpos podrían competir con DOM1H-131-206 por la unión a ADA.

**Ejemplo 2: Sustituciones de aminoácidos en el marco estructural VH de DOM1h-131-206**

El DOM1H-131-206 libre no marcado compite por la unión a ADA y da como resultado una intensidad de señal reducida en el ensayo de ADA de DOM1H-131-206 tal como se ha descrito anteriormente. Este "ensayo de confirmación" se usó, por lo tanto, para determinar si los materiales de ensayo, por ejemplo DOM1H-131-206, versiones modificadas de DOM1H-131-206, u otras moléculas basadas en anticuerpos ("material de ensayo"), podrían inhibir también la unión a ADA de DOM1H-131-206.

Para investigar si la unión de ADA al marco estructural VH podría reducirse, se realizó una serie de sustituciones de aminoácidos y otras modificaciones al marco estructural de DOM1h-131-206 mediante técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio estándar.

Las moléculas con sustituciones (materiales de ensayo) se analizaron usando el procedimiento siguiente (ensayo de confirmación):

Procedimiento del ensayo de confirmación de DOM1H-131-206 (que puede usarse para analizar dAb VH para evaluar su unión a ADA):

1. Se incuban previamente 10 µg/ml de DOM1H-131-206 u otro material de ensayo tal como dAb modificados durante 1 hora ± 5 minutos a TA con suero humano positivo en ADA al 4 % en diluyente de ensayo (caseína al 1 % en PBS).
2. Una placa MSD™ con estreptavidina se bloquea con 150 µl/pocillo de caseína bloqueante en PBS (al 1 %) a temperatura ambiente (TA) durante 1-2 horas. El bloqueante se elimina sin lavar.
3. En una placa de ensayo de microvaloración, la muestra que contiene suero humano positivo en ADA y 10 µg/ml de material de ensayo tal como dAb modificados se añade a una mezcla homogénea de DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) biotinilado (fármaco), DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) rutenilado ("Sulfo-Tag"™) (fármaco) en diluyente de ensayo (caseína al 1 % en PBS) de tal modo que las concentraciones finales sean de suero humano positivo en ADA al 2 %, 0,1 µg/ml de DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) biotinilado (fármaco) y 0,1 µg/ml de DOM1H-131-206 (SEC ID N° 1) rutenilado ("Sulfo-Tag"™) (fármaco) y se incuba durante 1 hora ± 5 minutos a TA.
4. Después de 1 hora de incubación, las muestras de ensayo se transfieren a una placa MSD bloqueada y la placa se incuba durante 1 hora ± 5 minutos en oscuridad a TA.
5. La placa MSD™ se lava después 3 veces con PBST.

6. Se añaden 150 µl/pocillo de tampón de lectura y la placa se lee.

5 Para cada experimento con un clon parental diferente (los resultados se muestran en la tabla 1) se analizaron muestras de suero humano de 10 sujetos positivos en ADA en el ensayo de confirmación anterior (en el ejemplo 2) : Los resultados se muestran en la tabla 1b tanto como % medio de inhibición de la señal (general) como también el % de sujetos con unión a ADA. Cuando más reducido sea el % de inhibición de la señal, el compuesto modificado será menos capaz de unirse a ADA. Se tomó un corte de aproximadamente el 40,5 % del % de inhibición de la señal para  
10 muestran una unión a ADA insignificante. Usando el ensayo de confirmación, se determinó que las sustituciones de aminoácidos en las posiciones siguientes reducían significativamente la unión de ADA preexistente a DOM1H-131-206 mientras que se mantenía la potencia para la unión al antígeno, es decir, la unión a TNFR1 tal como se determinó usando un procedimiento de ensayo de afinidad a TNFR1 mostrado en el ejemplo 5c (los resultados se muestran en la tabla 1): P14A, P41A, L108Q.

**Ejemplo 3: Extensiones de aminoácidos al marco estructural VH de DOM1h-131-206**

15 Para determinar si la modificación del extremo C terminal del marco estructural VH podría reducir la unión a ADA, se realizó una serie de modificaciones en el extremo C terminal en los marcos estructurales mediante técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio estándar. Las moléculas con sustituciones (materiales de ensayo) se analizaron usando el "ensayo de confirmación" tal como se ha descrito previamente en el ejemplo 2) y los resultados se muestran en la tabla 1.

20 La extensión en el extremo C terminal de DOM1H-131-206 o de otras moléculas analizadas también redujo significativamente la unión a ADA preexistente (tabla 1, tabla 2). Los resultados mostrados en la tabla 2 también se obtuvieron usando el 'ensayo de confirmación' tal como se ha descrito previamente en el ejemplo 2. Éste está ejemplificado por extensiones A, AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP, AAA y todas las extensiones más largas analizadas. Los clones VHH que no han sido humanizados tienen generalmente niveles inferiores de unión a ADA.

Tabla 1: Valoración de unión de ADA a mutantes de DOM1H-131-206

Clon parental	Modificación de secuencia	% medio de inhibición de señal en el ensayo de confirmación (valor medio de 10 sujetos)	% de sujetos con unión a ADA (10 sujetos)
DOM 1H-131-206	No modificada	99,47	100
DOM 1H-131-206	Q13A	99,21	100
DOM 1H-131-206	P14A	58,32	100
DOM 1H-131-206	P41A	87,35	100
DOM 1H-131-206	K43A	99,51	100
DOM 1H-131-206	G44E	99,47	100
DOM 1H-131-206	R83A	99,32	100
DOM 1H-131-206	H91S	99,38	100
DOM 1H-131-206	L108Q	90,92	100
DOM 1H-131-206	P14A, G44E	61,61	100
DOM 1H-131-206	G44E, H91S	99,11	100
DOM 1H-131-206	P14A, H91S	50,23	60
DOM 1H-131-206	G44E, L108Q	91,29	100
DOM 1H-131-206	No modificada	96,13	100
DOM 1H-131-206	A C-terminal	15,74	0
DOM 1H-131-206	AS C-terminal	16,28	0
DOM 1H-131-206	AST C-terminal	26,41	50
DOM 1H-131-206	ASTK C-terminal	19,60	40
DOM 1H-131-206	ASTKG C-terminal	28,27	40
DOM 1H-131-206	ASTKGP C-terminal	42,63	60

% de inhibición = unión a ADA (% de inhibición de señal cuando la proteína dada compite en el ensayo puente de ADA (ensayo de confirmación)).

Tabla 2: Valoración de la unión a ADA de moléculas VHH y anticuerpo de dominio VH con extensiones C terminales

Clon parental	Modificación de secuencia	% medio de inhibición de señal en el ensayo de confirmación (valor medio de 10 sujetos)	% de sujetos con unión a ADA (10 sujetos)
Pascolizumab-DT04-H-033	No modificada	99,48	100
Pascolizumab-DT04-H-033	AAA C-terminal	3,46	0
Pascolizumab-DT04-H-033	AST C-terminal	3,44	0
Pascolizumab-DT04-H-033	AS C-terminal	4,12	0
Pascolizumab-DT04-H-033	A C-terminal	7,46	0
DOM1h-574-208	No modificada	94,13	100
Fusión DOM1h-574-208 - VL	dAb VL C-terminal	4,43	0
DT04-H-033	AAA C-terminal	10,98	0
DT04-H-033	AST C-terminal	14,00	0
DT04-H-033	AS C-terminal	8,26	0
DT04-H-033	A C-terminal	12,48	0
DT04-H-033	FLAG (una secuencia peptídica de 6 aminoácidos) C-terminal	12,80	0
Clon 2 de VHH - 40842 (IL6R)	No modificada	18,66	20
Clon 7 de VHH - 40842 (IL6R)	No modificada	21,96	20
Clon 3 de VHH - 40955 (RANKL-Camélido)	No modificada	23,68	20
Clon 8 de VHH - 41015 (RANKL-Camélido)	No modificada	20,08	20
Clon 9 de VHH - 41016 (RANKL-humanizado)	No modificada	88,45	100

5 % de inhibición = unión a ADA (% de inhibición de señal cuando la proteína dada compite en el ensayo puente de ADA)

La secuencia de la etiqueta FLAG puede encontrarse en Nature Biotechnology 1988, Vol 16, páginas 1204-1210.

Nótese que se toma el 40 % de inhibición de la señal (medio) (o menos del 40 % de inhibición de la señal) para mostrar una unión a ADA insignificante.

10 **Ejemplo 4: Combinación de sustituciones de aminoácidos y extensión en el extremo C terminal en el marco estructural VH de DOM1H-131-206**

15 Para determinar si una combinación de sustituciones de aminoácidos y modificación del extremo C terminal del marco estructural VH podría reducir la unión a ADA, se realizaron una serie de modificaciones en el extremo C y/o sustituciones de aminoácidos en los marcos estructurales mediante técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio estándar. Las moléculas con sustituciones se analizaron usando el "ensayo de confirmación" descrito previamente en el ejemplo 2). Los resultados se muestran a continuación en la tabla 3:

Tabla 3:

Clon parental	Modificación de secuencia	% medio de inhibición de señal en el ensayo de confirmación (valor medio de 10 sujetos)	% de sujetos con unión a ADA (10 sujetos)
DOM 1H-131-206	A C-terminal	1,12	0
DOM 1H-131-206	ASTKG C-terminal	1,77	0
DOM 1H-131-206	P14A + A C-terminal	8,76	0
DOM 1H-131-206	P14A + ASTKG C-terminal	11,93	0
DOM 1H-131-206	AST C-terminal	34,96	20
DOM 1H-131-206	Delección de S ( $\Delta$ S) C-terminal	44,67	40
DOM 1H-131-206	P14E	47,22	60
DOM 1H-131-206	P14K	46,70	50
DOM 1H-131-206	P14Q	52,87	60
DOM 1H-131-206	P14T	68,86	100
DOM 1H-131-206	L11A	97,96	100
DOM 1H-131-206	A84T	90,96	100
DOM 1H-131-206	L108A	94,30	100
DOM 1H-131-206	T110A	78,84	100
DOM 1H-131-206	S112A	77,11	80
DOM 1H-131-206	P14K + A C-terminal	29,13	10
DOM 1H-131-206	P14K + ASTKG C-terminal	25,01	10
DOM 1H-131-206	P14Q + A C-terminal	29,66	20
DOM 1H-131-206	P14Q + ASTKG C-terminal	21,76	10
DOM 1H-131-206	P14T + A C-terminal	32,97	20
DOM 1H-131-206	P14T + ASTKG C-terminal	17,19	0

#### **Ejemplos 5a y 5b: Afinidad de la extensión en el extremo C terminal de DOM1H-131-206**

5 Se realizaron estudios adicionales para determinar si las modificaciones en DOM1H-131-206 que reducen la unión a ADA preexistente daban como resultado algún cambio en la afinidad de este dAb por su diana, TNFR1 humano.

#### **Ejemplo 5a: Valoración de la unión de TNFR1 a mutantes de DOM1H-131-206 mediante ELISA**

10 La capacidad de variantes modificadas de DOM 1H-131-206 (dAb de ensayo) para unirse a TNFR1 humano se determinó por ELISA. Se observó que la mutación estructural y las modificaciones en el extremo C terminal que se mostraron para reducir la unión a ADA preexistente tenían generalmente una unión comparable a TNFR1 en comparación con el dAb DOM1H-131-206. La excepción fue DOM1H-131-206 con una extensión en el extremo C terminal de ASTKGP, que tenía una  $CE_{50}$  5 veces inferior por la unión a TNFR1 en comparación con el dAb DOM1H-131-206 parental.

#### **Protocolo del ensayo de unión de TNFR1 por ELISA:**

- 15 1. Se añade TNFR1-Fc recombinante humano (R&D Systems) a placas ELISA de 96 pocillos a una concentración final de 0,1  $\mu$ g/ml en tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,4 (Pierce).
2. Después de una incubación durante la noche a 4 °C, se elimina el exceso de TNFR1:Fc lavando tres veces con tampón de lavado (tampón de lavado: Tween-20 al 0,1 %/PBS) y tres veces con PBS.
- 20 3. Las placas se bloquean con BSA al 1 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. se elimina el bloque lavando como anteriormente y después se añaden muestras de dAb de ensayo diluidas en diluyente de ensayo (BSA al 0,1 % + Tween-20 al 0,05 %/PBS) a la placa y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Después de lavar como anteriormente, se añade una Ig (específica de Vh) anti-humana de conejo policlonal a una dilución de 1:1000 en diluyente de ensayo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Después de lavar como anteriormente, se añade un HRP anti-conejo de ratón a una dilución de 1:10.000 en diluyente de ensayo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Después de lavar como anteriormente se añaden 100 uL de sustrato SureBlue TMB a cada pocillo. Una vez se ha desarrollado un color azul suficiente, la reacción enzimática se detiene con 100 µL de HCl 1 M y la placa se lee a 450 nm.
7. Las curvas de respuesta a la dosis para cada dAb de ensayo se preparan representando la concentración frente a valores de absorbancia. Los valores de CE50 para la unión de dAb a TNFR1 se determinan usando Graphpad Prism.

Tabla 4a. Valoración de la unión a TNFR1 para mutantes de DOM1H-131-206

Clon parental	Modificación de secuencia	CE50 media para la unión a TNFR1 (nM)
DOM 1H-131-206	No modificada	1,99
DOM 1H-131-206	Q13A	1,75
DOM 1H-131-206	P14A	1,22
DOM 1H-131-206	P41A	0,59
DOM 1H-131-206	K43A	0,67
DOM 1H-131-206	G44E	0,86
DOM 1H-131-206	R83A	0,76
DOM 1H-131-206	H91S	0,96
DOM 1H-131-206	L108Q	0,85
DOM 1H-131-206	P14A,G44E	2,03
DOM 1H-131-206	G44E, H91S	3,50
DOM 1H-131-206	P14A, H91S	0,75
DOM 1H-131-206	G44E, L108Q	1,64
DOM 1H-131-206	No modificada	1,99
DOM 1H-131-206	A C-terminal	1,21
DOM 1H-131-206	ASTK C-terminal	1,59
DOM 1H-131-206	ASTKG C-terminal	1,11
DOM 1H-131-206	ASTKGP C-terminal	11,89

Tabla 4b: Valoración de la unión de TNFR1 para mutantes de DOM1H-131-206

Clon parental	Modificación de secuencia	CE50 media para la unión a TNFR1 (nM)
DOM 1H-131-206	No modificada	0,67
DOM 1H-131-206	P14A + A C-terminal	0,57
DOM 1H-131-206	P14A + ASTKG C-terminal	1,47
DOM 1H-131-206	AST C-terminal	1,99
DOM 1H-131-206	Delección de S ( $\Delta$ S) C-terminal	0,50

(continuación)

Clon parental	Modificación de secuencia	CE50 media para la unión a TNFR1 (nM)
DOM 1H-131-206	P14E	0,64
DOM 1H-131-206	P14K	0,72
DOM 1H-131-206	P14Q	0,91
DOM 1H-131-206	P14T	0,77
DOM 1H-131-206	L11A	0,51
DOM 1H-131-206	A84T	0,79
DOM 1H-131-206	L108A	0,70
DOM 1H-131-206	T110A	0,29
DOM 1H-131-206	S112A	1,19
DOM 1H-131-206	P14K + A C-terminal	0,46
DOM 1H-131-206	P14K + ASTKG C-terminal	0,48
DOM 1H-131-206	P14Q + A C-terminal	0,46
DOM 1H-131-206	P14Q + ASTKG C-terminal	1,10
DOM 1H-131-206	P14T + A C-terminal	0,66
DOM 1H-131-206	P14T + ASTKG C-terminal	0,72

Tabla 4c: Valoración de la unión de TNFR1 para mutantes de DOM1H-131-206

Clon parental	Modificación de secuencia	CE50 media para la unión a TNFR1 (nM)
DOM 1H-131-206	No modificada	1,97
DOM 1H-131-206	A C-terminal	2,71
DOM 1H-131-206	P14A + A C-terminal	2,22
DOM 1H-131-206	ASTKG C-terminal	1,90
DOM 1H-131-206	P14A +I ASTKG C-termina	4,64

#### 5 **Ejemplo 4b: Procedimiento de ensayo de afinidad de TNFR1 usando Biacore™**

La afinidad de un dAb DOM1H-131-206 con una extensión de A en el extremo C se determinó mediante resonancia de plasmón superficial usando un Biacore™ T100. Se inmovilizó anticuerpo IgG anti-humano a un chip CM4 y se capturó TNFR1:Fc humano en esta superficie a un nivel de aproximadamente 60 unidades relativas. Se inyectaron materiales de ensayo diluidos en tampón a concentraciones finales de 25 nM a 0,024 nM (en un intervalo de dilución de 4 veces) sobre el TNFR1:Fc. Se generaron curvas de unión de doble referencia usando una curva de material de ensayo 0 nM, y los datos se introdujeron en un modelo de unión 1:1 para generar datos cinéticos. La unión de material de ensayo a TNFR1 de mono cynomolgus se determinó del mismo modo. Los datos cinéticos de unión se muestran a continuación en la tabla 4d siguiente.

En conclusión, la cinética de unión de dAb TNFR1 modificado (es decir, con adición de A en el extremo C) y no modificado fueron similares.

Tabla 4d:

	Modificación de DOM1H-131-206	Cinética de unión		
		Ka (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )m(x10 <sup>6</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )m(x10 <sup>-4</sup> )	KD (M) (x10 <sup>-11</sup> )
TNFR1 humano	A C-terminal	9,02	2,29	2,53
	No modificada	9,94	1,42	1,43
TNFR1 de mono Cynomolgus	No modificada	10,10	1,51	1,50
	A C-terminal	9,60	1,89	1,97

(no se calcularon errores para los datos anteriores)

#### 5 **Ejemplo 6: Farmacocinética de la extensión en el extremo C terminal de DOM1H-131-206**

Se realizaron estudios adicionales para determinar si las modificaciones en DOM1H-131-206 que reducen la unión a ADA preexistente daban como resultado algún cambio en la farmacocinética de este dAb.

##### Procedimiento farmacocinético

10 La exposición sistémica de DOM 1H-131-206 y DOM 1H-131-206 con una extensión de alanina en el extremo C terminal se determinó en monos Cynomolgus. Se dosificaron grupos separados de 5 monos Cynomolgus con materiales de ensayo mediante una infusión intravenosa de 30 minutos. Se recogieron muestras de plasma hasta 48 horas después de la dosificación y los niveles de los dos materiales de ensayo se determinaron por inmunoensayo. Brevemente, se añadió anticuerpo biotinilado específico al material de ensayo a una placa de microvaloración de 96 pocillos, siguiendo lo cual se añadieron las muestras de plasma de mono. Se añadió TNFR1:Fc humano marcado con digoxigenina, después de lo cual se añadió una peroxidasa de rábano picante conjugada con anticuerpo anti-digoxigenina. Finalmente se añadió sustrato TMB (disponible de R+D systems) y la cantidad de material de ensayo se determinó por cálculo retroactivo de la señal colorimétrica a partir de una curva estándar de material de ensayo.

15 No se observaron cambios notables (> 2 veces) en parámetros de exposición sistémica promediados por sexo cuando se comparó DOM-1H131-206 con DOM-1H131-206 + A en monos cynomolgus después de la infusión intravenosa. Concluimos que las modificaciones en DOM1H-131-206 mediante la adición de una extensión en el extremo C (+A) no afectaron a la farmacodinámica del dAb (mostradas en la tabla 5).

Tabla 5: Farmacocinética de mutantes de DOM1H-131-206 después de una dosis única intravenosa en monos Cynomolgus

Clon parental	Modificación de secuencia	Semivida en plasma ± Desviación típica	Eliminación (ml/min/kg)	Volumen de distribución ± Desviación típica
DOM 1H-131-206	No modificada	2,80 ± 0,32	1,48 ± 0,21	0,25 ± 0,05
DOM 1H-131-206	A C-terminal	2,57 ± 0,64	2,31 ± 0,49	0,34 ± 0,04

#### 25 **Ejemplo 7a: Expresión de variantes de DOM1H-131-206**

30 Para determinar si las modificaciones en el marco estructural VH que reducen la unión a ADA preexistente tienen un efecto sobre la expresión del dAb anti-TNFR1, el rendimiento de un panel de variantes modificadas de dAb DOM1H 131-206 anti-TNFR1 se comparó con el clon parental después de cultivo en recipientes de fermentación de 1 litro. Los dAb de ensayo incorporaban una extensión en el extremo C (+A o +ASTKG), con o sin sustitución en el marco estructural (P14A). Los dAb de ensayo se expresaron en la misma cepa de *E. Coli* usando el mismo vector de expresión microbiano (pave011 (Avecia)) que el DOM1H 131-206 (SEC ID N° 1) modificado. A un nivel de expresión a escala pequeña (1l), el rendimiento general para los dAb con las extensiones en el extremo C terminal +A o +ASTKG fue similar al clon parental no modificado. El rendimiento de dAb con la sustitución P14A y la extensión en el extremo C (+A o +ASTKG) se redujo en comparación con el clon parental no modificado (tabla 6a).

##### Procedimiento de expresión

Se completó una etapa de "expansión de semillas" inoculando un recipiente con agitación de 100 ml con un vial de células de *E. Coli* que expresan el constructo dAb en un vector de expresión microbiano.

Después de aproximadamente 10 horas de crecimiento el recipiente de semillas se usa para inocular a 1 l de fermentador. El proceso de producción consta de tres etapas, alimentación discontinua, alimentación

semidiscontinua e inducción. La fase de alimentación inicial discontinua dura aproximadamente 13 horas durante las cuales el cultivo se cultiva exponencialmente a 37 °C (que se reduce gradualmente a 30 °C durante las últimas 4 horas) hasta que la fuente de carbono primario, glicerina, se agota. En el momento del agotamiento de la glicerina tiene lugar un máximo en oxígeno disuelto (OD) y comienza la alimentación de nutriente (etapa de alimentación semidiscontinua). Aproximadamente 5 horas después del comienzo de la alimentación de nutrientes (a una DO<sub>600</sub> de 75) el cultivo se induce con IPTG (etapa de inducción) y durante esta fase del proceso se fabrica producto y se libera en el medio. La alimentación se detiene aproximadamente 48 horas después de la inducción y la cantidad de dAb en el sobrenadante se cuantificó por HPLC.

Tabla 6a. Expresión de valoraciones de variantes de DOM1H-131-206

Clon parental	Modificación de secuencia	Valoración del sobrenadante recogido (g/l)
DOM1H-131-206	No modificada	2,71
DOM1H-131-206	A C-terminal	3,15
DOM1H-131-206	ASTKG C-terminal	2,22
DOM1H-131-206	P14A + A C-terminal	0,29
DOM1H-131-206	P14A + ASTKG C-terminal	0,18

Las conclusiones de este experimento son las siguientes:

1) DOM1H-131-206 +A, DOM1H-131-206 +ASTKG y mutantes silvestres exhibieron una expresión de dAb muy buena.

La valoración más alta fue de aproximadamente 3000 mg/l.

2) Los mutantes DOM1H-131-206 P14 +A y DOM1H-131-206 p14 +ASTKG no pudieron expresar dAb en el proceso.

3) En general, DOM1H-131-206 +A y DOM1H-131-206+ASTKG fueron comparables con el tipo silvestre en términos de nivel de expresión de dAb

#### **Ejemplo 7b: Estabilidad de DOM1H-131-206 con una alanina en el extremo C**

La estabilidad de la extensión de alanina en el extremo C terminal de DOM 1H-131-206+A se determinó en suero humano, homogeneizado de pulmón u homogeneizado de hígado medidos usando un inmunoensayo validado para DOM 1H-131-206 (descrito más adelante) que detecta DOM 1H-131-206 pero que tiene una reactividad cruzada muy débil con DOM 1H-131-206+A. Esto es debido al hecho de que el anticuerpo de detección M2.3G10.1G06 se une fuertemente a DOM 1H-131-206 pero pobremente a DOM 1H-131-206 +A. El formato de ensayo usa TNFR1:Fc humano como reactivo de captura y, por lo tanto, se considera que es específico para dAb funcional intacto.

Se observó que el plasma fortalecido con 2 µg/ml de DOM 1H-131-206 +A dio una lectura de ~ 6,4 ng/ml en este ensayo, mientras que el tampón fortalecido con 2 µg/ml de GSK2862277 dio una lectura de 11,3 ng/ml. De este modo, la reactividad cruzada de DOM 1H-131-206 +A en el ensayo de DOM 1H-131-206 se estimó en entre el 0,25 y 0,5 %.

Para estudiar la conversión, se fortalecieron sangre completa humana, homogeneizado de pulmón humano (10 mg de proteína/ml) u homogeneizado de hígado humano (10 mg de proteína/ml) con 1 µg/ml de DOM 1H-131-206, DOM 1H-131-206 +A o tampón (sin fármaco añadido). Siguiendo una incubación de 0, 3 h, 6 h ó 24 h, se reigió el plasma/sobrenadante por centrifugación y las muestras se congelaron antes del ensayo de DOM 1H-131-206 usando el inmunoensayo validado (intervalo de trabajo de 0,1 a 10 ng/ml).

Durante 24 h no hubo evidencia de conversión significativa de DOM 1H-131-206 +A a DOM 1H-131-206 en ninguna matriz, lo que se habría evidenciado por un aumento de la señal en el inmunoensayo (debido a la formación de DOM 1H-131-206). Esto sugiere que la alanina del extremo C terminal adicional no es propensa a una escisión proteolítica rápida.

#### **Protocolo para el inmunoensayo validado de DOM 11H-131-206**

Se diluyó mAb anti-VH biotinilado (M2.3G10.1G06) en tampón de ensayo (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1 %, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,5) y se añadieron 100 µl a una concentración final de 10 ng/ml a cada pocillo de una placa recubierta con neutravidina (Pierce). La placa se sella y se incuba durante 1 hora a 37 °C.

La placa de microvaloración se lava 5 veces con 300 µl de tampón de lavado (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,5) usando un lavador de placas.

Se añaden 100 µl por pocillo de patrones y muestras diluidas en matriz y la placa se sella y se incuba con agitación constante durante aproximadamente 2 horas a 37 °C.

La placa de microvaloración se lava 5 veces con 300 µl de tampón de lavado.

Se añaden 100 µl por pocillo de hTNFR1:Fc (1:40.000) etiquetado con digoxigenina y la placa se sella y se incuba con agitación constante durante aproximadamente 2 horas a 37 °C.

La placa de microvaloración se lava 5 veces con 300 µl de tampón de lavado.

- 5 Se añaden 100 µl por pocillo de anticuerpo anti-digoxigenina de ratón marcado con HRP (Abcam)(1:20.000) y solución, sello con cinta de sellado aséptica, y la placa se sella y se incuba con agitación constante durante aproximadamente 2 horas a 37 °C.

La placa de microvaloración se lava 5 veces con 300 µl de tampón de lavado.

- 10 Se añaden 100 µl por pocillo de sustrato TMB (Thermo) y la placa se incuba con agitación constante durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añaden 100 µl por pocillo de solución de detención de sustrato TMB (Sigma) y se lee la absorbancia a 450 nm para cada pocillo usando un lector de placas. La curva patrón se ajusta a un algoritmo logístico de cuatro parámetros ponderado 1/x usando SMS2000 y las muestras desconocidas se interpolan a partir de la curva.

15 **Ejemplo 7c: Capacidad de DOM1H-131-206 con una extensión de alanina de en extremo C (+A) para inhibir la transducción de la señal de TNFR1:**

- El TNF $\alpha$  señala a través de la ruta de NF $\kappa$ B y da como resultado la secreción de diversas citocinas, incluida IL-8. En células no estimuladas, el ARNm de IL-8 se degrada rápidamente. No obstante, en presencia de TNF $\alpha$ , la activación de la ruta de NF $\kappa$ B causa la estabilización de ARNm de IL-8. Esta estabilización da como resultado un aumento de ARNm y contribuye a la inducción de la secreción de IL-8. Por lo tanto, en este ensayo, la inducción de IL-8 secretado es para determinar si la adición de una extensión en el extremo C afecta a la capacidad de DOM1H-131-206 o DOM1H-131-206+A (es decir, una extensión de alanina en el extremo C) para inhibir la transducción de la señal de TNFR1. Estos estudios se llevaron a cabo en líneas celulares humanas y de mono *Cynomolgus* y también en sangre completa humana y de mono *Cynomolgus*. La comparación de valores de CI<sub>50</sub> indica que la extensión del extremo C de DOM1H-131-206 que redujo la unión a ADA preexistente no afectó negativamente a la capacidad de DOM1H-131-206 para inhibir la transducción de la señal mediante TNFR1 en células bien humanas o bien de mono *Cynomolgus* (tabla 6b).

Protocolo para determinar la inhibición de IL-8 inducida por TNF $\alpha$  en fibroblastos de pulmón humanos

- La capacidad de DOM1H-131-206 o DOM1H-131-206+A para prevenir la unión de TNF $\alpha$  a TNFR1 humano y para inhibir la secreción de IL-8 se determinó usando células MRC-5 de fibroblasto de pulmón humano (ATCC). Las células MRC-5 se incubaron con las muestras de ensayo durante una hora después de lo cual se añadió TNF $\alpha$  (220 pg/ml). Siguiendo a la incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas el sobrenadante se recolectó y se almacenó a -20 °C hasta que se realizó el ensayo de MSD™ para IL-8 según el protocolo del fabricante para muestras de cultivo de tejidos. Los sobrenadantes se diluyeron 1 en 12 en el diluyente calibrador suministrado para el ensayo. El ajuste de la curva se realizó en GraphPad Prism con el fin de determinar la CI<sub>50</sub>.

35 Protocolo para determinar la inhibición de IL-8 inducida por TNF $\alpha$  en células A549

- Se sembraron células A549 en placas de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo y se incubaron durante la noche a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % para permitir la adherencia. Las células se incubaron después durante una hora en presencia de DOM1H-131-206 o DOM1H-131-206+A a diversas concentraciones en el intervalo de 0,01 nM – 1000 nM. Cada concentración se analizó en pocillos por duplicado. Siguiendo a la incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas el sobrenadante se recolectó y se almacenó a -20 °C hasta que se realizó el ensayo de MSD™ para IL-8 según el protocolo del fabricante para muestras de cultivo de tejidos. Los sobrenadantes se diluyeron 1 a 5 en el diluyente calibrador suministrado antes del ensayo. Los ajustes de la curva y los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon usando XLFit.

Protocolo para determinar la inhibición de IL-8 inducida por TNF $\alpha$  en células CYNOM-K1

- 45 Se incubaron células CYNOM-K1 durante una hora en presencia de DOM1H-131-206 o DOM1H-131-206+A a diversas concentraciones empezando por 100 nM. Se siguió con la estimulación con TNF $\alpha$  a una concentración final de 1 ng/ml. Siguiendo a la incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas el sobrenadante se recolectó y se almacenó a -20 °C hasta que se realizó el ensayo de MSD™ para IL-8 según el protocolo del fabricante para muestras de cultivo de tejidos. Los sobrenadantes se diluyeron 1 a 12 en el diluyente calibrador suministrado para el ensayo. El ajuste de la curva se realizó en GraphPad Prism con el fin de determinar la CI<sub>50</sub>.

Protocolo para determinar la inhibición de IL-8 inducida por TNF $\alpha$  en sangre completa humana

- Se recogió sangre de donantes voluntarios sanos (con el consentimiento apropiado en consecuencia con el Acta de Tejidos Humanos del Reino Unido) en heparina sódica. Se preparó medio de ensayo añadiendo BSA al 1 % a medios RPMI-1640 (sin rojo fenol). Se diluyeron DOM1H-131-206 o DOM1H-131-206+A y dAb ficticio de V<sub>H</sub> en placas de 96 pocillos en medio de ensayo de modo que la concentración final después de la adición de sangre fuera de 800 nM, y se realizaron diluciones seriadas 1 en 2 hasta 0,01 nM. Se añadieron 130 µl de sangre por pocillo y las placas se incubaron durante una hora (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %) para permitir la unión a TNFR1. Las muestras de sangre se estimularon después con 10 µl de TNF $\alpha$  diluido en medio de ensayo de modo que la concentración final fuera de 10 ng/ml. Cada condición se analizó por duplicado. Siguiendo a una incubación adicional de 24 horas (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %), se añadieron 110 µl de PBS por pocillo para aumentar el volumen de las muestras, que se agitaron después en un agitador de placas durante 10 minutos a 500 rpm y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El plasma

se transfirió a una placa nueva y se almacenó a -80 °C hasta que se realizó el ensayo MSD™ de IL-8 según el protocolo del fabricante para muestras de suero y plasma. Los ajustes de la curva y los valores de  $CI_{50}$  se calcularon usando XLFit.

Protocolo para determinar la inhibición de IL-8 inducida por LPS en sangre completa de mono *Cynomolgus*

- 5 Se recogieron 12 ml de sangre de 4 monos *Cynomolgus* en heparina sódica. Se preparó medio de ensayo añadiendo BSA al 1 % a medios RPMI-1640 (sin rojo fenol). Se diluyeron DOM1H-131-206 o DOM1H-131-206+A y dAb ficticio  $V_H$  en placas de 96 pocillos en medio de ensayo a una concentración final 15X. Cada concentración se analizó por triplicado. Se añadieron 130  $\mu$ l de sangre por pocillo y las placas se incubaron durante una hora (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %) antes de la estimulación con 10  $\mu$ l de LPS diluido en medio de ensayo de tal modo que la concentración final fuera de 94 ng/ml. Las placas se incubaron después durante 24 h adicionales (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %). Siguiendo la incubación se añadieron 110  $\mu$ l de PBS por pocillo para aumentar el volumen de las muestras, que se agitaron después en un agitador de placas durante 10 minutos a 500 rpm y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. El plasma se transfirió a una placa nueva y se almacenó a -80 °C hasta que se midió la IL-8 usando el ensayo MSD™ para IL-8 humana realizado según el protocolo del fabricante para muestras en suero y plasma. El plasma no estaba diluido en el ensayo. Los ajustes de la curva y los valores de  $CI_{50}$  se calcularon usando XLFit.

Tabla 6b: Resumen de la potencia de DOM1H-131-206 en comparación con DOM1H-131-206 +A en ensayos basados en células humanas y de mono:

	$CI_{50}$ (nM) $\pm$ desviación típica	
	DOM1H-131-206	DOM1H-131-206+A
Fibroblasto de pulmón humano MRC5 (n=3)	4,8 $\pm$ 2,4	3,5 $\pm$ 2,5
Epitelio de pulmón humano A549 (n=2)	1,0 $\pm$ 0,23	1,0 $\pm$ 0,28
Fibroblastos de piel de mono <i>Cynomolgus</i> CYNOMK1 (n=2)	4,8 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,7
Sangre humana completa (n=3-5)	1,6 $\pm$ 1,0	0,9 $\pm$ 0,3
Sangre completa de mono <i>Cynomolgus</i> (n=3)	0,5 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,3

20 **Ejemplo 7d: Uso de anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 para el tratamiento de psoriasis**

En estos estudios, se usó el anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 1) así como ortólogos de roedor de este anticuerpo de dominio. Los datos obtenidos con estas moléculas se usaron para seleccionar las dosis y protocolos de tratamiento descritos en el presente documento para su uso en el tratamiento de psoriasis, y placas psoriáticas, en pacientes humanos a los que se va a administrar bien DOM1h-131-206 (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 1, o bien la molécula fijada a ADA DOM1h-131-206 con una alanina terminal (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16), o bien una molécula fijada a ADA DOM1h131206 que comprende ADA fijada (es decir, cualquier modificación de unión disminuida de un dAb a ADA) tal como se divulga en el presente documento.

30 Por ejemplo, la farmacocinética derivada de estudios *in vivo* con monos *Cynomolgus* mostró que el anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 (con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 1) tiene una eliminación en plasma de 2,4 ml/min/kg, lo que se aproxima a la tasa de filtración glomerular (GFR) en monos y da una semivida de eliminación de aproximadamente 3 horas. El volumen de distribución para este anticuerpo de dominio fue de 0,26 l/kg lo que iguala aproximadamente el volumen extravascular y sugiere una distribución fuera del compartimento de plasma central. Cuando el anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 se administró a un compartimento extravascular (por ejemplo, cuando se inhala en los pulmones) hay solo un cambio pequeño en la semivida de eliminación observada que refleja la cinética limitante de la tasa de absorción.

Además, siguiendo la dosificación intradérmica de un ortólogo roedor de dAb anti-TNFR1 ("Dom1m-15-12") a ratones, se observó un lapso de absorción incluso más grande. Esto puede haberse debido a una diferencia más grande entre el GFR y la eliminación de la tasa de absorción siguiendo la dosificación por vía intradérmica. La velocidad de eliminación terminal observada en plasma de ratón fue aproximadamente de 40 minutos, que era más elevada que la de la administración intravenosa siguiente (aproximadamente 20 minutos). La velocidad de eliminación ( $K_e$ ) más lenta observada en plasma siguiendo la administración intradérmica se corroboró mediante la PK del tejido dérmico que mostró una velocidad de eliminación terminal de 5-7 horas ( $K_e$  0,1-0,14 h<sup>-1</sup>), aunque la fracción de la dosis que conduce la velocidad de eliminación aparentemente prolongada se estimó que era pequeña (0,5 %). La velocidad de absorción dérmica ( $K_a$ ) en plasma se definió a partir de un estudio en ratas con dosificación intradérmica de un dAb ortólogo de roedor y fue relativamente rápida ( $K_a=4,1$  h<sup>-1</sup>) dando como resultado una  $T_{max}$  observada a aproximadamente 1 hora después de la dosis. Se estimó que el 10 % del anticuerpo de dominio se mantuvo dentro del compartimento dérmico de la rata con una velocidad de eliminación asumida desde la piel similar al ratón. Por lo tanto, parece que siguiendo la inyección intradérmica, el anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 se

distribuye en tejidos vascularizados de la piel (por ejemplo, la dermis) en los que se extrae rápidamente en el plasma y se elimina por filtración renal. La fase de distribución y absorción inicial a través de los tejidos de la piel se refleja en la demora en la absorción antes de que las exposiciones en plasma fueran medibles. Dadas las diferencias anatómicas entre la piel de roedor y ser humano, se esperaba que la velocidad de absorción en seres humanos fuera más elevada, lo que a su vez conduce a una exposición en plasma más reducida/no medible del anticuerpo de dominio DOM1h-131-206. Esto significa que las predicciones de exposición en plasma se basan en observaciones de estudios con roedores y, por lo tanto, sirven como estimación conservativa de la exposición en plasma en seres humanos.

El anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 1) se dosificó también a voluntarios sanos por infusión intravenosa (hasta 3 horas de duración) de hasta 2 mg/kg y en un ensayo publicado mediante inhalación en voluntarios sanos. Los parámetros farmacocinéticos derivados fueron generalmente muy consecuentes con datos preclínicos en monos cynomolgus. Siguiendo la administración intravenosa la eliminación fue de 0,6-1,5 ml/min/kg (GFR en seres humanos aproximadamente 1,8 ml/min/kg) con una semivida de eliminación resultante de 5 horas. El volumen de distribución, aproximadamente 0,3 l/kg, fue similar al volumen extravascular. La distribución rápida del anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 en el compartimento extravascular se confirmó mediante una medición de lavado broncoalveolar (fluido de revestimiento epitelial de pulmón) siguiendo la administración IV. Los niveles en el fluido extravascular de pulmón fueron aproximadamente del 4-14 % de los niveles de plasma medidos a 5 horas del comienzo de la dosificación siguiendo una infusión de 3 horas.

Las predicciones de eficacia en seres humanos se han estimado sobre la base de las estimaciones de exposición observadas y predichas dentro del compartimento dérmico y datos de línea celular humana *in vitro*. Los intervalos de  $Cl_{50}$  (8-40 ng/ml) en estos sistemas *in vitro* (variando complejidad y tipo de células) se han usado como diana a través de niveles dentro del compartimento dérmico y han facilitado la selección de las dosis de anticuerpo de dominio y protocolos de tratamiento para el tratamiento de psoriasis y placas psoriáticas en pacientes humanos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la dosis inicial de 0,5 mg se eligió para lograr una exposición en plasma que asumía el peor caso de exposición sistémica, inferior a los logrados en el estudio intravenoso FTIH en el que se observó agonismo en sujetos positivos en ADA. A esta dosis inicial de partida se espera que la señalización mediada por TNFR1 se inhibe dentro de una zona discreta alrededor del sitio de inyección (< 2 cm<sup>2</sup> de área superficial) a un nivel  $\geq 90$  % inmediatamente después de la dosificación. La inhibición de TNFR1 a lo largo del tiempo es dependiente de la cantidad de fármaco administrada, mantenida y después eliminada del compartimento dérmico. Asumiendo un mínimo (10 % de retención dérmica y  $Ke$  0,1-0,14 h<sup>-1</sup> como en ratas) se esperó que los niveles se mantendrían  $\geq Cl_{50}$  (dentro de una zona de inyección/ensayo) durante un mínimo de 3 días siguiendo una inyección intradérmica de 0,5 mg del anticuerpo de dominio DOM1h-131-206.

Para la selección de las dosis de anticuerpo de dominio y protocolos de tratamiento se realizaron predicciones de exposición en plasma humano siguiendo la dosificación intradérmica del anticuerpo de dominio DOM1h-131-206. Estas predicciones asumían la exposición máxima posible que pudiera lograrse para una inyección intradérmica. Los datos de concentración-tiempo en plasma humano reales a partir del anticuerpo de dominio DOM1h-131-206 administrado intravenosamente se usaron en un modelo de PK dérmico humano con una velocidad de absorción fijada (escalada de la absorción dérmica en roedores) y una biodisponibilidad del 100 %. El perfil de concentración-tiempo en plasma humano para una dosis de dominio máximo y protocolos de tratamiento descritos en el presente documento (2 mg semanalmente + 0,5 mg cada dos semanas) se examinó después. Esto reveló que las concentraciones en plasma máximas predichas alcanzaron la  $T_{max}$  rápidamente dentro de un periodo de 30 minutos después de la dosificación, y los niveles cayeron rápidamente a niveles inferiores el límite de cuantificación inferior del actual ensayo en plasma (0,1 ng/ml) dentro de un periodo de 24 horas. La no acumulación en dosificación repetida se esperó en plasma incluso usando esta predicción de exposición máxima posible. No obstante, esta predicción representa la exposición en plasma más elevada posible y es posible que las exposiciones pudieran ser significativamente inferiores a las predichas e incluso tan bajas que la exposición en plasma puede no ser medible. Usando niveles diana de inhibición (sobre la base de ensayos basados en células *in vitro*) se predijo que a niveles de  $Cl_{90}$  (inmediatamente después de la dosificación) o  $Cl_{50}$  (desarrollo) en la piel en los protocolos de tratamiento descritos en el presente documento estarán en el intervalo de 30-80 ng/ml o 8-40 ng/ml respectivamente.

Sobre la base de la información anterior, las exposiciones en plasma predichas ( $C_{max}$  y AUC) para la primera dosis, dosis diaria máxima y dosis acumulativa, durante 28 días, se muestran en la tabla 6b siguiente junto con los márgenes de seguridad respecto a la seguridad preclínica.

Tabla 6b:

Primera dosis – 0,5 mg semanalmente		Seguridad múltiple <sup>1</sup>
$C_{max}$	ng/ml	933
$AUC_{(0-48 h)}$	ng.h/ml	2137
$AUC_{(0-28 d)}$	ng.h/ml	537
Dosis máxima - 2 mg semanalmente + 0,5 mg cada dos semanas		
$C_{max}$	ng/ml	187
$AUC_{(0-48 h)}$	ng.h/ml	427

(continuación)

AUC <sub>(0-7 d)</sub>	ng·h/ml	356
AUC <sub>(0-28 d)</sub>	ng·h/ml	89

5 Durante los 14 días del estudio toxicológico con buena práctica de laboratorio en cynomolgus de dosis repetida en monos macho (20 mg/kg/día) sobre la base de la media de las exposiciones en los machos (días 1,4 y 14) ( $C_{max}$  y AUC<sub>(0-24 h)</sub> de 48,5 ug/ml y 249 ug·h/ml respectivamente).

Finalmente, la información presentada anteriormente de los estudios *in vitro*, estudios *in vivo* y los análisis relacionados se usó para seleccionar las dosis del anticuerpo de dominio y protocolos de tratamiento útiles en el tratamiento de psoriasis en pacientes humanos.

10 La administración de los anticuerpos de dominio según un protocolo de tratamiento tal como se ha divulgado en el presente documento es útil en el tratamiento de psoriasis. La eficacia del anticuerpo de dominio para tratar psoriasis, tal como en un protocolo de tratamiento particular, puede confirmarse mediante la medición de placas con sonografía y/o evaluaciones clínicas.

15 La sonografía, mediciones basadas en ultrasonidos de alta frecuencia, puede realizarse usando un sonografo de alta frecuencia a 20 MHz (DUB USB, Taberna pro Medicum, Lueneburg). Los análisis A seriados pueden componerse y presentarse en un monitor como una sección de la piel. Una resolución lateral de aproximadamente 200 µm y una resolución axial de 80 µm son posibles y preferentes. Dependiendo de los patrones de eco, componentes de la epidermis, dermis y subcutis que estén presentes, la medición exacta del espesor de la piel es posible. El infiltrado psoriático inflamatorio en un sitio de placa psoriática se observa con una banda ecolucente claramente definida inferior al eco de entrada. El espesor de la banda psoriática ecolucente puede determinarse y documentarse antes de la administración del anticuerpo de dominio y después de la administración del anticuerpo de dominio. El espesor puede medirse en µm. Una disminución del espesor de la banda psoriática ecolucente después de la administración de un anticuerpo de dominio demuestra que la administración de un anticuerpo de dominio, como según un protocolo de tratamiento divulgado en el presente documento, ha sido eficaz en el tratamiento de psoriasis, y de una placa psoriática, en un paciente humano. Véase, por ejemplo, Bangha y col., 9 *Skin Pharmacol.* 298 (1996).

25 La valoración clínica puede realizarse usando una clasificación de 5 puntos determinada por comparación en la clínica de una placa psoriática en la que se ha inyectado un anticuerpo de dominio con al menos una placa no tratada cerca de la placa psoriática tratada. Según esta comparación se asignaron las siguientes clasificaciones de valoración clínica (las clasificaciones de valoración clínica son 0 por definición antes de la primera administración de un anticuerpo de dominio):

30 -1 = empeorado  
0 = sin cambios (ningún efecto)  
1 = ligera mejora  
2 = mejora clara pero no completamente curado  
3 = completamente curado

35 Por lo tanto, sobre esta base, una clasificación de valoración clínica aumentada después de la administración de un anticuerpo de dominio según un protocolo de tratamiento tal como se divulga en el presente documento indica eficacia en el tratamiento de psoriasis, y de una placa psoriática, en un paciente humano.

#### **Ejemplo 8: Extensiones de una única alanina en clones de VHH.**

40 La unión de ADA a VHH se observó usando el ensayo de confirmación usado en el ejemplo 2 (para DOM1H-131-206). Con el fin de confirmar que podría lograrse una inhibición similar de la unión a ADA mediante secuencias de VHH modificadas, se analizaron tres clones de VHH con secuencias de aminoácidos tal como se muestran en la figura 2 (d), (e) y (f):

45 El clon VHH2(d) es un formato biespecifico que tiene un módulo de unión a IL6R enlazado por medio de GGGSGGGGS a un módulo de unión a albúmina de suero humano tal como se describe en el documento WO2010100135. (La secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 2d: SEC ID N° 4)

El clon VHH2(e) es un formato biespecifico que tiene un módulo de unión a TNF enlazado a un módulo de unión a albúmina de suero unido a su vez a un módulo de unión a TNF usando GGGSGGGGS como enlazador tal como se describe en el documento WO2010077422. (La secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 2e: SEC ID N° 5)

50 El clon VHH2(f) es formato mono específico bivalente que comprende dos módulos idénticos enlazados por medio de un enlazador Ala-Ala-Ala, siendo cada módulo un dAb que puede unirse a un dominio A1 del factor de Von-Willebrand tal como se muestra en el documento WO2009115614A2. (La secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 2f: SEC ID N° 6)

55 Los tres clones anteriores se modificaron mediante la adición de una alanina en el extremo C terminal al resto de serina terminal y los clones modificados y no modificados se compararon usando el ensayo del ejemplo 2. Como puede observarse más adelante en la tabla 7 y figura 4, los resultados muestran que la extensión en el extremo C de un único resto de aminoácido alanina reduce la unión a ADA.

Tabla 7:

Muestra	VHH2(d)	VHH2(d) +A	VHH2(e)	VHH2(e) +A	VHH2(f)	VHH2(f) +A
% medio de inhibición	93,23	18,86	94,93	16,95	94,15	17,46

**Ejemplo 9: Frecuencia de sujetos sanos con ADA preexistente a un intervalo de moléculas basadas en dAb V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>**

Procedimiento de ensayo de ADA

5 De forma similar al procedimiento descrito en el ejemplo 1 para DOM1H-131-206, moléculas de ensayo (DOM 1H-131-206 (SEC ID N° 1), DOM 1H-131-206 + extensión de alanina en el extremo C (SEC ID N° 16), mAb-VH (SEC ID N°), un secuencia péptido-VL, VH-VL (SEC ID N° 11), la molécula '735 (SEC ID N° 30 y 31), se biotinilaron, se sometieron a un cambio de tampón y se almacenaron en tampón de formulación. Estas moléculas de ensayo se marcaron después con rutenio y después se sometieron a un cambio de tampón y se almacenaron en tampón de formulación.

El anticuerpo antifármaco (ADA) para cada molécula es un ensayo puente realizado en una plataforma de tecnología ECL (electroquimioluminiscencia) MSD™ tal como se ha descrito anteriormente. El resumen del procedimiento de ensayo usado en este experimento se describe a continuación:

1. Una placa de estreptavidina MSD™ se bloquea con 150 µl/pocillo de caseína bloqueante en PBS (al 1 %) a temperatura ambiente (TA) durante 1-2 horas. El bloqueante se elimina sin lavar.
2. Después de 1 hora de preincubación, una mezcla homogénea que contiene 0,1 µg/ml de molécula de ensayo biotinilado, 0,1 µg/ml de molécula de ensayo ("Sulfo-Tag"™) rutenilada y muestra en suero al 2 % en diluyente de ensayo (1 % de caseína en PBS) se transfiere a la placa MSD™ y se incuba durante 1 hora ± 5 minutos a TA.
3. La placa MSD se lava después 3 veces con PBST.
4. Se añaden 150 µl/pocillo de tampón de lectura y la placa se lee.

Se usaron las concentraciones anteriores y tiempos de incubación para moléculas DOM1H-131-206.

El experto entenderá que las concentraciones y tiempos de incubación precisos se optimizarán, por ejemplo el DOM1H-131-206 (y versiones modificadas) puede tener concentraciones y tiempos de incubación ligeramente diferentes en comparación con, por ejemplo, un DOM10H-53-567 o una secuencia péptido-VL.

25 Un panel de muestras de suero de 100 donantes humanos sanos se analizó para determinar la reactividad en el ensayo. Se detectaron anticuerpos preexistentes (ADA) contra la el marco estructural de cadena ligera variable (VL), también en muestras de suero humano normales, aunque en una magnitud y frecuencia inferior a la que se observó previamente contra los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>HH</sub> (véase la figura 4). Los resultados se muestran en la figura 5 en la que el eje Y muestra niveles de unión a ADA y los dAb V<sub>H</sub> tenían la incidencia más elevada de unión a ADA.

30 Las conclusiones fueron: los resultados mostrados en la figura 5 muestran el nivel de unión de ADA preexistentes al DOM 1H-131-206 y el efecto de la adición de una extensión en el extremo C en la unión del DOM 1H -131-206 modificado a ADA. Puede observarse a partir de la figura 5 que la unión de ADA preexistentes a dAb VH también se observaron cuando está fusionado a un mAb (mAb-VH). La figura 5 también muestr que existe unión de ADA preexistentes a dAb V kappa (Vκ) (VL) y los ejemplos mostrados incluyen péptido:VL, fusión VH-VL y una fusión mAb-VL.

**Ejemplo 10: Extensiones de aminoácidos en el marco estructural VL**

Ya que también se detectaron anticuerpos preexistentes contra el marco estructural VL (VK) en muestras de suero humano aunque a un nivel generalmente inferior al observado en el marco estructural VH (véase la figura 5), se determinó si las modificaciones de la región del extremo C de dAb VK podría reducir la unión a ADA preexistentes, tal como se había demostrado para moléculas que contienen VH.

40 Sobre la base de una molécula mAb:enlazador: V<sub>L</sub> (denominada '735 – esta molécula es "mAbdAb" – es un IL-13mAb:enlazante:IL-4 (v Kappa) dAb), se generó un panel de moléculas de ensayo mAb:enlazante: V<sub>L</sub> mediante mutagénesis dirigida al sitio estándar, y que contenía la misma secuencia de dAb VL, pero tiene diversas modificaciones en el extremo C terminal con respecto a dAb VL. Estos materiales de ensayo denominados '15014', '15019', '15020' y '15021' se diseñaron para tener una extensión en el extremo C (+AAA, +T o +TV), o para tener una delección en el extremo C (-R) (mostrada más adelante en la tabla 8).

50 Estos materiales de ensayo se analizaron usando un "ensayo de confirmación" tal como se ha descrito anteriormente, similar al descrito previamente para dAb V<sub>H</sub>. El análisis de los compuestos se realizó evaluando la capacidad de compuestos individuales para competir con compuestos específicos de ensayo marcados por la unión a anticuerpo preexistentes. Cualquier reducción potencial en la señal de ensayo se comunicó como % de inhibición. El porcentaje de niveles de inhibición superior al punto de corte confirmatorio determinado previamente para este ensayo particular sugiere que el compuesto de ensayo compite con el compuesto específico de ensayo por su unión a anticuerpos anti-VK, y, por lo tanto, puede compartir epítipo(s) con el compuesto específico de ensayo.

55 Procedimiento de ensayo de confirmación de ADA '735 usado para medir la frecuencia de ADA preexistente a V kappa:

1. En una placa de ensayo de microvaloración se incuba una muestra de suero positivo en ADA al 2 % en diluyente de ensayo (caseína al 1 % en PBS) durante 1 hora  $\pm$  5 minutos a TA con una concentración final de 10  $\mu$ g/ml de '735 u otro material de ensayo tal como dAb modificados.
2. Después de 1 hora de preincubación, se añadió una mezcla homogénea que contenía 0,05  $\mu$ g/ml de '735 biotinilado y 0,05  $\mu$ g/ml de '735 ("Sulfo-Tag"™) rutenilado, en diluyente de ensayo (caseína al 1 % en PBS) a la placa de ensayo y se incuba durante la noche a TA.
3. Después de la incubación, la placa MSD se lava después 3 veces con PBST, las muestras de ensayo se transfieren a la placa MSD y la placa se incuba durante 1 hora  $\pm$  5 minutos en oscuridad a TA.
4. La placa MSD™ se lava después 3 veces con PBST.
5. Se añaden 150  $\mu$ l/pocillo de tampón de lectura y la placa se lee.

Los resultados de estos análisis de compuestos se presentan en la tabla 8. Todas las modificaciones del extremo C analizadas (+AAA, +T, +TV y -R) mostraron una inhibición reducida en el ensayo de confirmación de '735. Esto sugiere que las modificaciones en el extremo C terminal a dAb VL eliminaron la unión a anticuerpo preexistentes (ADA) de un modo similar a dAb VH.

Tabla 8: Valoración de la unión a ADA de muetantes '735 mAb:VL

Clon	Modificación de secuencia (realizada al componente dAb de la molécula mAbdAb)	% de inhibición en el ensayo de confirmación (valor medio de 7 sujetos donantes)	% de sujetos con unión a ADA
'735	No modificada	74,92	100
15014	+AAA	-4,40	14,29
15019	+T	12,88	14,29
15020	+TV	8,53	0
15021	-R	20,08	0

#### **Ejemplo 11: Extensiones de aminoácidos al marco estructural VH de DOM10H-53-567 (dAb anti-IL-13)**

Ya que las modificaciones en el extremo C terminal al dAb VH anti-TNFR1 DOM 1H-131-206 redujeron la unión a ADA preexistente, se determinó si la modificación en el extremo C podría reducir la unión a ADA a una molécula VH diferente. Las modificaciones en el extremo C se realizaron en el marco estructural VH de DOM10H-53-567 mediante técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio estándar. Las moléculas con sustituciones (materiales de ensayo) se analizaron usando el ensayo de confirmación descrito previamente.

La extensión del extremo C de DOM10H-53-567 también reduce significativamente la unión a ADA preexistente (los resultados se muestran más adelante en la tabla 9). Esta está ejemplificada por las extensiones A, AS, AST, ASTK, ASTKG y ASTKG. Estas modificaciones no afectan negativamente a la capacidad de clones de DOM10H-53-567 para unirse a, e inhibir, su antígeno diana IL-13 tal como se confirmó mediante el ensayo de actividad de dAb IL-13 descrito más adelante y los resultados se muestran en la tabla 9b .

Tabla 9a. Valoración de unión a ADA de mutantes de DOM10H-53-567

Clon parental	Modificación de secuencia	% de inhibición en el ensayo de confirmación (valor medio de 10 sujetos donantes)	% de sujetos con unión a ADA
DOM 10H-53-567	No modificada	95,06	100
DOM 10H-53-567	A C-terminal	12,84	10
DOM 10H-53-567	AS C-terminal	14,79	10
DOM 10H-53-567	AST C-terminal	29,02	20
DOM 10H-53-567	ASTK C-terminal	27,67	20
DOM 10H-53-567	ASTKG C-terminal	13,39	10

#### **30 Protocolo de ensayo de actividad de dAb IL-13:**

Se usó un bioensayo para medir la capacidad de variantes de moléculas de DOM10H-53-567 para inhibirla producción de fosfatasa alcalina estimulada por IL-13 humana recombinante en células HEKBlue-STAT6 *in vitro*. Se plaquearon células HEK-STAT6 (Invivogen) (que expresan fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) mediante el control del promotor dependiente de STAT6) en placas de 96 pocillos. Se preequilibraron IL-13 humano a una

concentración de 3 ng/ml y una serie de diluciones de moléculas DOM1-H-53-567 durante 1 hora a temperatura ambiente y después se añadieron a las células durante 24 horas a 37 °C. Siguiendo a la incubación, las concentraciones de sobrenadante de SEAP producido por las células como resultado de la estimulación de IL-13 se determinaron mediante la adición de Quanti-Blue (Invivogen) y se obtuvo una lectura de la densidad óptica a 640 nm. Los valores de CI50 se calcularon a partir de las curvas de respuesta a la dosis usando Graphpad Prism.

Tabla 9b: Valoración de la actividad de mutantes DOM10H-53-567

Parental Clon	Secuencia Modificación	CI50 (nM) media de inhibición de SEAP inducido por IL-13 (valor medio de entre 2 y 4 experimentos)
DOM 10H-53-567	No modificada	0,56
DOM 10H-53-567	A C-terminal	0,59
DOM 10H-53-567	AS C-terminal	0,56
DOM 10H-53-567	AST C-terminal	0,68
DOM 10H-53-567	ASTK C-terminal	0,75
DOM 10H-53-567	ASTKG C-terminal	0,40

La extensión en el extremo C de DOM10H-53-567 que redujo la unión a ADA preexistente no afectó negativamente a la capacidad de dAb DOM10H-53-567 para unirse a, e inhibir, su antígeno diana (IL-13 humano).

#### 10 **Ejemplo 12a: Clonación de moléculas dAb-Fc-dAb VH/Vk anti-VEGF con extremos C modificados**

Los dAb-Fc-dAb Vh-Vk con modificaciones realizadas en el extremo C de la porción dAb Vk: Se diseñaron DMS30047-30054 generando las secuencias de variantes de dAb Vk por PCR y después volviendo a clonar en DMS30045 (SEC ID N° 40) y DMS30046 (SEC ID N° 41), respectivamente, para generar los vectores de expresión de mamífero modificados. A partir de DMS30045: (i) se eliminó el resto arginina del extremo C para generar DMS30047 (DMS30037 -R), (ii) se añadió una alanina en el extremo C para generar DMS30048 (que es DMS30037 + A) (SEC ID N° 43), (iii) se añadieron tres alaninas en el extremo C para generar DMS30049 (DMS30037 + AAA) (SEC ID N° 44) y se añadió una treonina en el extremo C para generar DMS30050 (DMS30037 + T) (SEC ID N° 45). A partir de DMS30046 (SEC ID N° 41): (i) se eliminó el resto arginina del extremo C terminal para generar DMS30051 (DMS30038 -R) (SEC ID N° 46), (ii) se añadió una alanina en el extremo C terminal para generar DMS30052 ((DMS30038 + A) (SEC ID N° 47) , (iii) se añadieron tres alaninas en el extremo C terminal para generar DMS30053 (DMS30038 + AAA) (SEC ID N° 48) y se añadió una treonina en el extremo C terminal para generar DMS30054 (DMS30038 + T) (SEC ID N° 43).

Las descripciones de las moléculas anteriores son como sigue:

DMS30045: dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal ((TGLDSP)x4), DMS30046: dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal ((TGLDSP)x4), DMS30047 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal menos R en el extremo C terminal ((TGLDSP)x4), DMS30048 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + A ((TGLDSP)x4), DMS30049 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + AAA ((TGLDSP)x4), DMS30050 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + T ((TGLDSP)x4), DMS30051 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal menos R C-terminal ((TGLDSP)x4), DMS30052 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal + A ((TGLDSP)x4), DMS30053 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal + AAA ((TGLDSP)x4), DMS30054 (contiene extremo C terminal modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal +T ((TGLDSP)x4) (las secuencias de aminoácidos de las moléculas se muestran en la figura 12 y las SEC ID N° 40-49).

#### **Ejemplo 12B: Las modificaciones en la región del extremo C del Abd V<sub>K</sub> VEGF de moléculas mancuerna DMS30037 y DMS30038 tienen unión reducida a anticuerpos preexistentes**

40 **Procedimiento de ensayo de confirmación de V kappa ADA usado para medir la frecuencia de ADA preexistente a V kappa:**

1. En una placa de ensayo de microvaloración se incubaba una muestra de suero positivo en ADA al 10 % en diluyente de ensayo (caseína al 1 % en PBS) durante 1 hora ± 5 minutos a TA con una concentración final de 10 µg/ml del material de ensayo tal como dAb modificados.
2. Después de 1 hora de preincubación, el suero/material de ensayo positivo en ADA se añade a una placa de ensayo con una mezcla homogénea que contiene dAb V kappa biotinilado (no modificado) y dAb V kappa rutenilado ("Sulfo-Tag"™) (no modificado) para una concentración de aproximadamente 0,025 µg/ml de dAb biotinilado, aproximadamente 0,0125 µg/ml de dAb rutenilado ("Sulfo-Tag"™) y suero positivo en ADA al 5 % en diluyente de ensayo (caseína al 1 % en PBS). La placa se incubaba durante 1 hora ± 5 minutos a TA.
3. Una placa de estreptavidina MSD™ se bloquea con 150 µl/pocillo de caseína bloqueante en PBS (al 1 %) a temperatura ambiente (TA) durante 1-2 horas. El bloqueante se elimina sin lavar.

4. Después de 1 hora de preincubación, la mezcla homogénea se añade a una placa de ensayo con estreptavidina MSD™ y se incuba durante 1 hora ± 5 minutos a TA.
5. Después de 1 hora de incubación, la placa MSD se lava después 3 veces con PBST, las muestras de ensayo se transfieren a la placa MSD y la placa se incuba durante 1 hora ± 5 minutos en oscuridad a TA.
6. La placa MSD™ se lava después 3 veces con PBST.
7. Se añaden 150 µl/pocillo de tampón de lectura y la placa se lee.

El experto entenderá que las concentraciones y tiempos de incubación precisos en los ensayos de confirmación se optimizarán, por ejemplo el DOM1H-131-206 (y versiones modificadas) puede tener concentraciones y tiempos de incubación ligeramente diferentes en comparación con un DOM10H-53-567.

- 10 Los resultados de estos análisis de compuestos se presentan en la tabla 9B más adelante. Todas las modificaciones en el extremo C analizadas en los dAb V kappa (+T, +A, +AAA y -R) mostraron una inhibición reducida en el ensayo de confirmación '697 anterior. Esto sugiere que las modificaciones en el extremo C a dAb V kappa redujeron la unión a anticuerpos preexistentes (ADA) de un modo similar a dAb Vh.

Tabla 9b: Valoración de la unión a ADA de mutantes de DMS3007 y DMS3008

Clon parental	Modificación de secuencia	% medio de inhibición de señal en el ensayo de confirmación (valor medio de 6 sujetos)	% de sujetos con unión a ADA (valor medio de 6 sujetos)
DMS30037	No modificada	60,46	100
DMS30050	Adición de T C-terminal	20,97	16,67
DMS30048	Adición de A C-terminal	12,86	16,67
DMS30049	Adición de AAA C-terminal	8,36	16,67
DMS30047	Delección -R C-terminal	6,17	16,67
DMS30038	No modificada	70,65	100
DMS30054	Adición de T C-terminal	14,66	16,67
DMS30051	Delección -R C-terminal	-5,91	16,67

15 **Ejemplo 13 - Expresión de moléculas dAb-Fc-dAb VH/Vk anti-VEGF con extremos C terminales modificados (DMS30047-30054)**

Los plásmidos de expresión que codifican las moléculas dAb-Fc-dAb anti-VEGF descritas anteriormente en el ejemplo 12a se transfectaron de forma transitoria en células HEK293 6E y se expresaron en una escala de 500 ml para producir las moléculas de fragmentos de anticuerpos usando el procedimiento descrito más adelante en este ejemplo. Los niveles de expresión >30 mg/l de sobrenadante se lograron rutinariamente.

Las secuencias de dAb se clonaron en el extremo N o C de un Fc genérico del isotipo IgG1 humano en un vector de expresión de mamífero. Los dAb se enlazaron al Fc usando una secuencia enlazadora: el enlazador en el extremo N terminal fue AAAS o TVAAPS y el enlazador en el extremo C fue ((GS(TVAAPSGS)x3) o el dominio de albúmina 3.

25 **Ejemplo 14 Purificación de moléculas dAb-Fc-dAb VH/Vk anti-VEGF con extremos C modificados**

Las moléculas dAb-Fc-dAb se purificaron para su afinidad a partir de sobrenadantes tal como se ha descrito en el ejemplo anterior.

**Ejemplo 15 Análisis molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño de dAb-Fc-dAb VH/Vk anti-VEGF con extremos C modificados**

30 La integridad molecular, homogeneidad y % de pureza de las moléculas dAb-Fc-dAb anti-VEGF que habían sido purificadas se analizó después mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se confirmó que las proteínas eran > 95 % proteína diana pura por SDS-PAGE y SEC antes de análisis posteriores en ensayos biológicos.

35 **Ejemplo 16 Unión de moléculas dAb-Fc-dAb VH/Vk anti-VEGF con extremos C modificados a VEGF en Biacore**

La afinidad de unión de determinadas moléculas dAb-Fc-dAb anti-VEGF, (con pequeñas modificaciones en el extremo C terminal) por VEGF<sub>165</sub> se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un Biacore T100. La proteína A se inmovilizó en un chip C1 mediante acoplamiento amínico primario y esta superficie

se usó después para capturar constructos anti-VEGF. El VEGF<sub>165</sub> recombinante humano (producido 'internamente' a partir de la transfección transitoria de células HEK293) se usó como analito a de 32 nM a 0,03125 nM en una serie de diluciones de 4 veces. Todas las curvas de unión se referenciaron por duplicado con una inyección de tampón (es decir 0 nM) y los datos se ajustaron al modelo 1:1 inherente a T100. La regeneración se llevó a cabo usando NaOH 50 mM. El proceso se realizó a 37 °C, usando HBS-EP como tampón de proceso. Los datos obtenidos se muestran en las tablas 10A, 10B y 10C. A partir de los datos de la tabla 10A, el comportamiento de DMS30037 y diversas variantes modificadas en el extremo C terminal: DMS30037+A (DMS30048), DMS30037+AAA (DMS30049) y DMS30037+T (DMS30050) (véase el ejemplo 12a para más detalles de estas moléculas) parece comparable en Biacore y las modificaciones en el extremo C terminal no parecen reducir la potencia con respecto al parental.

Un conjunto adicional de datos se muestra en la tabla 10B en la que la actuación de DMS30037 y DMS30038 se comparó con variantes modificadas en el extremo C terminal: DMS30037-R, (marcado como +R (DMS30047), DMS30037+T (DMS30050) y DMS30038-R, (marcado como +R (DMS30051) y Bevacizumab (Avastin) en el Biacore. En este conjunto de datos de nuevo el comportamiento de todas las moléculas parece comparable en Biacore y las modificaciones del extremo C terminal no parecen reducir la potencia con respecto al compuesto parental. Podrían no capturarse datos significativos diferentes de la observación de la curva para avastin. Un conjunto adicional de datos se muestra en la tabla 10C en la que las moléculas DMS30037 y DMS30038 se comparó con variantes modificadas en el extremo C terminal: DMS30037-R, (DMS30047), DMS30037+T (DMS30050), DMS30038-R, (DMS30051) y DMS30038+T (DMS30054) y Bevacizumab (Avastin). De nuevo el comportamiento de todas las moléculas dAb-Fc-dAb parece comparable en Biacore y las modificaciones del extremo C terminal no parecen reducir la potencia con respecto al compuesto parental. En este conjunto de datos, véase la tabla 10C, los datos de Bevacizumab (Avastin) no pudieron medirse adecuadamente debido a que la constante de disociación era demasiado estrecha.

Tabla 10A. Unión de la molécula dAb-Fc-dAb anti-VEGF: DMS30037 con modificaciones en el extremo C a VEGF<sub>165</sub> y comparación con DMS30037.

Ligando	Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	KD (M)
DMS30037	8,18E+06	4,34E-05	5,30E-12
DMS30037+A	8,25E+06	5,21E-05	6,32E-12
DMS30037+AAA	7,74E+06	5,37E-05	6,94E-12
DMS30038+T	8,03E+06	4,21E-05	5,24E-12

Tabla 10B: Unión de las moléculas dAb-Fc-dAb anti-VEGF: DMS30037 y DMS30038 con modificaciones en el extremo C a VEGF<sub>165</sub> y comparación con dAb-Fc-dAb parental y Bevacizumab (Avastin).

Ligando	Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	KD (M)
DMS30037	1,04E+07	4,39E-05	4,22E-12
DMS30037+R	1,07E+07	4,22E-05	3,94E-12
DMS30037+T	1,10E+07	4,27E-05	3,90E-12
DMS30038	1,03E+07	4,79E-05	4,64E-12
DMS30038+R	1,23E+07	5,31E-05	4,31E-12
Avastin	8,39E+05	Fuera de rango	Fuera de rango

Tabla 10C Unión de las moléculas dAb-Fc-dAb anti-VEGF: DMS30037 y DMS30038 con modificaciones en el extremo C a VEGF<sub>165</sub> y comparación con dAb-Fc-dAb parental y Bevacizumab (Avastin).

Ligando	Ka	Kd	KD
DMS30037	5,60E+06	1,46E-04	2,61E-11
DMS30037+T	5,38E+06	1,42E-04	2,64E-11
DMS30037-R	6,97E+06	1,55E-04	2,22E-11
DMS30038	5,69E+06	1,55E-04	2,73E-11
DMS30038+T	5,90E+06	1,58E-04	2,68E-11
DMS30038-R	8,28E+06	1,22E-04	1,47E-11
Avastin	1,24E+06	Fuera de rango	Fuera de rango

**Ejemplo 17 Ensayo de unión al receptor VEGF R2 de dAb-Fc-dAb VH/Vk anti-VEGF con extremos C modificados**

Las potencias de moléculas dAb-Fc-dAb Vh/Vk anti-VEGF sobre la base de DMS30037 y DMS30038, pero con modificaciones en el extremo C, se compararon ambas con la molécula silvestre y Bevacizumab (Avastin), en el receptor 2 de VEGF, (R2), ensayo de unión usando el procedimiento modificado, es decir sin preincubación, tal como se ha descrito anteriormente en este ejemplo. Los datos se muestran en la tabla 11A, todas las moléculas dAb-Fc-dAb analizadas: DMS30037, DMS30037+T (DMS30050), DMS30037-R (DMS30047), DMS30038, DMS30038-R (DMS30051), parecen tener una potencia comparable y son considerablemente más potentes que Bevacizumab (Avastin), tabla 11A. Hubo una pequeña variación en el porcentaje de inhibición máximo logrado por las moléculas en el ensayo con todas las moléculas logrando > 93-98 % de inhibición máxima, (los datos no se muestran).

Se generaron datos adicionales comparando las dAb-Fc-dAb: DMS30038, DMS30038+T, (DMS30050) and DMS30038-R, (DMS30051) con Bevacizumab (Avastin), en el mismo formato de ensayo, los datos se representan en la tabla 11B. A partir de los datos DMS30038 y sus variantes de extremo C, (tabla 11B), tienen potencias similares evaluadas por sus valores de CE50 en el ensayo RBA y parecen ser considerablemente más potentes que Bevacizumab (Avastin) con estos criterios. Hubo una pequeña variación en el porcentaje de inhibición máximo logrado por las moléculas en el ensayo con todas las moléculas logrando > 94 % de inhibición máxima, (los datos no se muestran).

Ensayo de unión al receptor de VEGF R2: Se analizaron las potencias en el ensayo de unión al receptor de VEGF en comparación con la de Bevacizumab (Avastin). Estas medidas de ensayo de unión de VEGF165 a bien VEGF R1 o bien VEGF R2 y la capacidad de las moléculas de ensayo para bloquear esta interacción. Una placa de 96 pocillos de unión estándar MSD (L11XA-3) se recubrió con 0,25 µg/ml de VEGF R1 (R&D Systems 321-FL) o VEGF R2 (R&D 357-KD) en tampón de bicarbonato (50 µl/pocillo), se cubrió con un sellador de placa y se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente la placa MSD se lavó 3 x 300 µl/pocillo con tampón de lavado Tris y se inmunotransfirió sobre un lecho de tejido para eliminar el exceso de tampón de los pocillos. La placa MSD se bloqueó después con BSA al 3 % en PBS (250 µl/pocillo) y se incubó con agitación (750 RPM) a temperatura ambiente durante 1 hora.

La placa MSD se lavó de nuevo antes de la adición de una concentración 2x de molécula anti-VEGF (25 µl/pocillo) y se incubó con agitación (750 RPM) a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de la adición de una concentración 2x de rhVEGF, 25 µl/pocillo, R&D Systems (293-VE/CF, fabricada en células de insecto usando baculovirus) o un GSK generado "internamente" de VEGF (fabricado en células HEK293 de mamífero, los últimos datos no se muestran excepto en la tabla 3A). Las moléculas anti-VEGF y el VEGF se prepararon usando BSA al 0,1% en PBS. En ensayo inicial se realizó con una etapa en la que la molécula anti-VEGF se preincubó con VEGF. Las preincubaciones se prepararon añadiendo un volumen igual a una concentración 2x de molécula anti-VEGF a un volumen igual de una concentración 2x de VEGF (R&D, 293-VE/CF) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La concentración final de VEGF usada fue de 10 ng/ml. No se incluyeron tampoco VEGF ni controles solos de VEGF. La placa MSD se incubó con agitación (750 RPM) a temperatura ambiente durante 2 horas después de lo cual se lavó de nuevo antes de la adición del reactivo de detección (50 µl/pocillo, anticuerpo biotinilado VEGF antihumano de cabra (R&D Systems BAF293) a 0,25 µg/ml en BSA al 1 % en PBS y se incubó con agitación (750 RPM) a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa MSD se lavó de nuevo antes de la adición de la estreptavidina sulfotag (50 µl/pocillo, MSD R32AD-1) a 2 µg/ml en BSA al 1 % en PBS y se incubó con agitación (750 RPM) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Antes de la medición de la electroquimioluminiscencia en un MSD Sector Imager 6000, la placa MSD se lavó y se añadieron 150 µl/pocillo de 2x tampón de lectura T (MSD R92TC-1). El ajuste de la curva y los cálculos de CE50 se realizaron usando GraphPad Prism. La capacidad de las moléculas de ensayo anti-VEGF y Bevacizumab (Avastin) para inhibir la unión de VEGF a VEGFR1 y VEGFR2 se determinó como se describe.

Procedimiento modificado: Se realizó un segundo ensayo con el que el agente anti-VEGF y el VEGF no se preincubaron antes de la adición a la placa MSD recubierta con receptor de VEGF. El ensayo se realizó y solo se usó VEGF procedente de R&D Systems, (293-VE/CF). La capacidad de las moléculas anti-VEGF y Bevacizumab (Avastin) para inhibir la unión de VEGF a VEGFR1 y VEGFR2 se determinó como se ha descrito anteriormente pero sin la etapa de preincubación.

Tabla 11A. Valores de CE<sub>50</sub> de dAb-Fc-dAb anti-VEGF con modificaciones en el extremo C en comparación con Bevacizumab (Avastin) en el ensayo de unión al receptor de VEGFR2 :

El ajuste de la curva y los cálculos de CE <sub>50</sub> se realizaron usando GraphPad Prism.		
VEGF R2 RBA	CE50	CE50
	(g/ml)	(pM)
Avastin	1,21 E-07	806
DMS30037	2,99 E-09	28
DMS30037 +T	2,98 E-09	28
DMS30037 -R	2,66 E-09	25

(continuación)

El ajuste de la curva y los cálculos de CE <sub>50</sub> se realizaron usando GraphPad Prism.		
<b>DMS30038</b>	3,37E-09	32
<b>DMS30038 -R</b>	3,84 E-09	37

Tabla 11B. Valores de CE<sub>50</sub> de dAb-Fc-dAb anti-VEGF con modificaciones en el extremo C terminal en comparación con Bevacizumab (Avastin) en el ensayo de unión al receptor de VEGFR2:

El ajuste de la curva y los cálculos de CE <sub>50</sub> se realizaron usando GraphPad Prism.		
<b>VEGF R2 RBA</b>	<b>CE50</b>	<b>CE50</b>
	<b>(g/ml)</b>	<b>(pM)</b>
<b>Avastin</b>	3,4 E-07	2266
<b>DMS30038</b>	5,28 E-09	50
<b>DMS30038 +T</b>	4,31 E-09	41
<b>DMS30038 -R</b>	4,53 E-09	43

5

**Ejemplo 18: Ensayo de proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC): Inhibición con moléculas dAb-Fc-dAb VH/Vk anti-VEGF con extremos C terminales modificados**

Las capacidades de las moléculas dAb-Fc-dAb sobre la base de DMS30037 y DMS30038 pero con modificaciones en el extremo C terminal: DMS30037-R (DMS30047) y DMS30037+T (DMS30050) , DMS30038-R (DMS30051) y DMS30038+T (DMS30054) para suprimir la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana se compararon con Bevacizumab (Avastin) usando el procedimiento descrito más adelante con las siguientes desviaciones (i) en vez de dejar los pocillos exteriores libres de células, se usó la totalidad de la placa y (ii) los datos se analizaron usando GraphPad Prism usando un ajuste de curva sigmodial, pendiente variable comparado con una regresión no lineal (pendiente variable). Los compuestos de ensayo se evaluaron independientemente sobre placas individuales frente a la molécula de comparación, Bevacizumab (Avastin); el ensayo se llevó a cabo en al menos tres ocasiones por separado, con un conjunto de datos total por molécula de Bevacizumab (Avastin): 15; DMS30037: 7; DMS30038: 8; DMS30037-R (DMS30047): 3; DMS30037+T (DMS30050): 4; DMS30038-R (DMS30051): 4 y DMS30038+T (DMS30054): 4, (datos no mostrados). Se enfocó sobre el análisis del grado de inhibición máximo y los valores de CE50 relativos en el ensayo generados por determinadas moléculas en comparación con los de Bevacizumab (Avastin).

Los datos se analizaron usando GraphPad Prism usando un ajuste de curva sigmodial, pendiente variable en comparación con regresión no lineal (pendiente variable). Los ajustes de curva individuales se realizaron para cada molécula y en cada día. Debido a algún ajuste pobre, se decidió introducir restricciones para la curva en la que no se observó una meseta en la concentración más baja. Se excluyó una placa de los análisis debido al ajuste pobre de la curva a pesar de las restricciones. Esta restricción sería igual a la media de los puntos en la concentración más baja. Los datos se seleccionaron manualmente tanto si el mínimo estaba restringido o no, y el ajuste de la curva y los parámetros se actualizaron automáticamente sobre la base de esta selección de criterios. Las estimaciones del máximo de curva y del error estándar se analizaron usando un análisis de varianza de modelo ponderado mixto, usando 1/ (error estándar)<sup>2</sup>, [SE]<sup>2</sup>, como ponderación. El análisis se ajustó para la variabilidad entre placas y días usando términos de efectos aleatorios. A partir de este análisis, las medias predichas se estimaron y se realizaron comparaciones con Avastin (control) (Véase la tabla 12A). Se realizó después el mismo análisis en escala log<sub>10</sub> para la CI50 y los resultados se transformaron de nuevo. A partir de esto, se generaron estimaciones de las medias geométricas y se realizaron comparaciones de nuevo con Avastin en forma de una relación de Avastin (control) es decir, una relación de 0,5 indicaría una caída del 50 % de la Avastin (véase la tabla 12B).

**Ensayo de proliferación de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC):**

Se analizaron moléculas anti-VEGF para evaluar su capacidad para suprimir la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana en comparación con la de Bevacizumab (Avastin). Este ensayo mide la medida de la proliferación de células endoteliales inducida por una concentración definida de VEGF<sub>165</sub> y la capacidad de antagonistas de VEGF para bloquear este efecto. Las HUVEC se sembraron a 5000 células por pocillo en placas recubiertas con gelatina de 96 pocillos, se dejaron libres de células los pocillos exteriores, y se incubó durante varias horas para permitir la adherencia. Las moléculas de ensayo se analizaron a concentraciones equimolares (max 3,33x10<sup>-08</sup> M) con una serie de diluciones de 2 veces, cada una por triplicado. El VEGF<sub>165</sub> se preparó en medio basal para obtener una concentración final de 75 ng/ml. El medio se eliminó manualmente de las monocapas celulares y se añadieron 50 µl para evitar que las células se secan. Se añadieron 25 µl de medio que contenía VEGF<sub>165</sub> y 25 µl de medio basal o medio que contenía anticuerpo de ensayo si era apropiado. Las células se incubaron durante 72 horas y después de este periodo se determinó el número total de células usando Ceil Titre Glo. El tratamiento de HUVEC con VEGF<sub>165</sub> dio como resultado un aumento del número total de células después de 72 horas, si se compara con las células no tratadas con VEGF<sub>165</sub> (datos no mostrados). Este aumento mediado por VEGF se

interpreta que representa los efectos acumulativos de VEGF tanto sobre la proliferación de HUVEC como en la prevención de la muerte celular de HUVEC. Los compuestos de ensayo se evaluaron independientemente en placas individuales frente a la moléculade comparación, Bevacizumab (Avastin).

- 5 Tabla 12A. Medias geométricas predichas de porcentaje de inhibición máximo de dAb-Fc-dAb anti-VEGF modificados en el extremo C terminal con el 95 % de intervalos de confianza (IC) en comparación con el compuesto parental y Bevacizumab (Avastin) en el ensayo de HUVEC:

mAb	Estimación	<i>Media predicha para un % de inhibición máximo</i>	
		Inferior 95 % de IC	Superior 95 % de IC
Avastin	71,0316	61,6741	80,3891
DMS30037	85,4759	74,9164	96,0354
DMS30037+T	89,9852	78,2698	101,70
DMS30037-R	82,2693	69,9929	94,5457
DMS30038	73,5602	63,7180	83,4023
DMS30038+T	79,0343	67,1904	90,8782
DMS30038-R	77,6519	65,5487	89,7550

- 10 A partir de este análisis, parece que las moléculas DMS30037, DMS30037+T y DMS30037-R conducen a la inhibición máxima en el ensayo de HUVEC y superan al grupo de Avastin, el intervalo de confianza no solapa la referencia cero de modo que los datos fueron estadísticamente significativos a partir de los de Avastin; los datos no se muestran (véase la tabla 12A).

Tabla 12B. Medias geométricas de CI50 de dAb-Fc-dAb anti-VEGF modificados en el extremo C con el 95 % de intervalos de confianza (IC) en comparación con el compuesto parental y Bevacizumab (Avastin) en el ensayo de HUVEC:

mAb	Estimación	<i>Media geométrica para CI50</i>	
		Inferior 95 % de IC	Superior 95 % de IC
Avastin	3,829 E-9	3,119 E-9	4,7 E-9
DMS30037	1,903 E-9	1,473 E-9	2,46 E-9
DMS30037+T	2,332 E-9	1,758 E-9	3,092 E-9
DMS30037-R	7,365 E-9	2,06 E-10	2,639 E-7
DMS30038	2,163 E-9	1,723 E-9	2,715 E-9
DMS30038+T	2,649 E-9	1,877 E-9	3,738 E-9
DMS30038-R	2,234 E-9	1,699 E-9	2,936 E-9

- 15 Un análisis similar de las medias geométrica de los valores de CI50 con intervalos de confianza del 95 %, (IC), mostró que todas las moléculas dAb-Fc-dAb DMS30037, DMS30037+T, DMS30038, DMS30038+T y DMS30038-R tenían valores de CI50 de forma estadísticamente significativa más reducidos que la Avastin, datos no mostrados (véase la tabla 18B). El conjunto de datos de DMS30037-R fue muy variable con un número n bajo (3).
- 20 En general, los datos sugieren que las modificaciones en el extremo C en ambos dAb-Fc-dAb: DMS30037 y DMS30038 tienen valores de CI50 y niveles de inhibición máxima en el ensayo de HUVEC que las moléculas parentales y parecen más potentes que Bevacizumab (Avastin), tanto en términos de porcentaje máximo de inhibición como de CI50 más bajo, (véanse las tablas 12A y 12B).

- 25 **Ejemplo 19 (mAb tool): El uso de un mAb anti-VH para definir el epítipo para la unión de ADA anti-VH preexistente:**

Un anticuerpo monoclonal (mAb anti-VH M2.3G10.1G06) se une al marco estructural VH de DOM1H-131-206 y se determinó que este mAb tiene una unión mucho más reducida a DOM1H-131-206 +A; por lo tanto, este anticuerpo parece unirse a un epítipo similar al ADA anti-VH humano preexistente.

Secuencias CDR de mAb anti-VH M2.3G10.1G06: Las secuencias CDR del mAb anti-VH M2.3G10.1G06 se amplificaron y secuenciaron a partir de la línea celular de hibridoma. Las secuencias de cadena pesada y ligera para el mAb M2.3G10.1G06 se muestran en [la secuencias de aminoácidos se muestran en las figuras 6a y 6b]. Las secuencias se clonaron en un vector de expresión de mAb IgG1 y se transfectaron en células de mamífero para expresar el mAb identificado.

El anticuerpo resultante se purificó a partir del sobrenadante celular y se analizó para evaluar su capacidad de unión al marco estructural de dAb VH.

Especificidad de mAb anti-VH M2.3G10.1G06: La especificidad del mAb M2.3G10.1G06 para unirse al marco estructural de dAb VH (con o sin una modificación que invalide la unión a ADA preexistente) se determinó midiendo la unión del mAb M2.3G10.1G06 en un ensayo de unión TNFR1:dAb realizado en una plataforma MSD™ (véase el ejemplo 1 para detalles de una plataforma MSD™). El ensayo de unión TNFR1:dAb se detalla más adelante. Se demostró que el mAb anti-VH M2.3G10.1G06 tiene una unión reducida al marco estructural VH en hasta el 85 % cuando el extremo C terminal está modificado mediante la extensión con alanina (1 a 15 % de unión residual) (los resultados se muestran en la tabla 13).

Competencia entre ADA anti-VH preexistente y mAb M2.3G10.1G06: Para confirmar que el mAb anti-VH M2.3G10.1G06 se une al mismo epítipo que ADA anti-VH en suero preexistente, se llevó a cabo un ensayo de competencia. Se determinó que el suero de un intervalo de donantes humanos con ADA anti-VH preexistente podría competir con el mAb anti-VH M2.3G10.1G06 por la unión a DOM1H-131-206 (los datos se muestran en la figura 7). Concluimos que el ADA anti-VH humano preexistente y el mAb anti-VH M2.3G10.1G06 comparten un epítipo solapado en el marco estructural VH.

Las modificaciones a dAb VH con interrupción del epítipo para la unión a ADA preexistente pueden predecirse sobre la base de la unión del mAb anti-VH M2.3G10.1G06. La unión de mAb anti-VH M2.3G10.1G06 puede usarse, por lo tanto, para analizar las modificaciones que conducen a una unión reducida a ADA preexistente.

Procedimientos usados:

Protocolo del ensayo de unión TNFR1:dAb

1. Se captura TNFR1:Fc en una placa MSD de unión alta durante la noche a 4 °C. La placa MSD se lava después 3 veces con MSD/tampón de lavado TRIS.
2. Las placas se bloquean con BSA al 3 % en PBS durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La placa MSD se lava después 3 veces con MSD/tampón de lavado TRIS.
3. Las series de diluciones del dAb de ensayo (DOM 1H-131-206 (SEC ID N° 1) o DOM 1H-131-206 con una extensión de alanina en el extremo C (SEC ID N° 16)) se añaden durante 2 horas a TA. La placa MSD se lava después 3 veces con MSD/tampón de lavado TRIS.
4. Se añade mAb M2.3G10.1G06 rutenilado a una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa MSD se lava después 3 veces con MSD/tampón de lavado TRIS.
5. Se añaden 150 µl/pocillo de tampón de lectura y la placa se lee.

Protocolo de ensayo de competencia para ADA anti-VH preexistente y mAb M2.3G10.1G06:

1. Se incubaron 0,2 µg/ml de molécula de ensayo (dAb) biotilina que era DOM 1H-131-206 (SEC ID N° 1) y muestra de suero al 20 % en diluyente de ensayo (caseína al 1 % en PBS) en una placa de ensayo de fondo redondo durante 1 hora ± 5 minutos a TA.
2. Se añade mAb anti-VH M2.3G10.1G06 rutenilado a una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Una placa MSD™ con estreptavidina se bloquea con 150 µl/pocillo de caseína bloqueante en PBS (al 1 %) a temperatura ambiente (TA) durante 1-2 horas.
4. Las muestras se transfieren a la placa de estreptavidina MSD™ y se incuban a temperatura ambiente (Ta) durante 1-2 horas.
5. La placa MSD se lava después 3 veces con PBST.
6. Se añaden 150 µl/pocillo de tampón de lectura y la placa se lee.

Tabla 13: Unión diferencial de mAb anti-VH a DOM1H-131-206 o DOM1H-131-206 modificados con una extensión en el extremo C

Concentración de dAb de ensayo (pg/ml)	Señal de ensayo de unión Valor medio de ECL ± DT		Unión relativa a DOM1H131-206 + A C-terminal (%)
	DOM1H-131-206	DOM1H-131-206 + A C-terminal	
270000	1168024 ± 3643	81489 ± 4537	7
90000	1078743 ± 17931	66020 ± 3207	6
30000	377493 ± 9653	11300 ± 266	3
10000	108173 ± 3413	1507 ± 69	1
3333	34479 ± 1397	743 ± 14	2

(continuación)

Concentración de dAb de ensayo (pg/ml)	Señal de ensayo de unión Valor medio de ECL ± DT		Unión relativa a DOM1H131-206 + A C-terminal (%)
	DOM1H-131-206	DOM1H-131-206 + A C-terminal	
1111	12026 ± 243	847 ± 226	7
370	4387 ± 41	669 ± 13	15
0	623 ± 2	621 ± 5	

5 Este mAb se une al marco estructural de dAb VH, por ejemplo DOM 1H-131-206 (SEC ID N° 1), pero la unión se reduce altamente en dAb con una modificación +A en el extremo C, por ejemplo DOM 1H-131-206 con una extensión de alanina C terminal (SEC ID N° 16). Las secuencias de cadenas H y L se determinaron a partir de hibridoma depositado en Biocat. Hubo solo una secuencia LC pero dos secuencias HC: una secuencia funcional (véase más adelante) y una no funcional que incluye codones de detención y cambios de fase.

10 La expresión del mAb y la confirmación de la unión frente a las dos moléculas anteriores sobre la base de la secuencia funcional predicha más adelante nos permitirán confirmar que tenemos la secuencia de mAb correcta para la presentación. El modo en que los constructos pTT5 se ensamblaron significa que solo la secuencia en letra no cursiva es del hibridoma, la cursiva es quimérica del vector pTT en el que se clonó (esto no se requiere para el ensayo de unión).

Cadena ligera

15 DIVMTQSQKFMSPTVGD<sup>R</sup>VSITC**KASQNVGTAVAWY**QQKPGQSPKLLIY**SASNRYT**GVDP  
RFTGSGSGTDFTLTINMQSEDLADYFC**QQYGSYPLT**FGGGTKLEIKRTVAAPS<sup>V</sup>FI**FP**  
SDEQLKSGTASVVCLLN<sup>F</sup>YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT  
LSKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada

20 EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLT**ESYMH**WVKQSHGKSLEWIG**VISPYNGGTSY**  
**NQKFKD**KATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCT**RRGIYYDPSWFAY**WGQGLTVTS  
AAKTTPPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
25 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD  
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 Región variable en tipo normal.  
CDR subrayadas/negrita  
Secuencia quimérica para Fc en cursiva.  
Fc es IgG1 humana.  
Las secuencias de la herramienta mAb se muestran en la figura 6 (SEC ID N° 14 y 15).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dominio variable de inmunoglobulina único, que se une a TNFR1 y que se selecciona de cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: (a) DOM1h-131-206 **caracterizada por** la SEQ ID NO:16; y (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 98 %, el 99 % o el 99,5 % idéntica a la secuencia de DOM1h-131-206 mostrada en la SEQ ID NO 1 y a la que se le ha añadido una extensión de una única alanina en el extremo C-terminal y que tiene una unión a ADA reducida en comparación con la SEQ ID NO:1 no modificada.
2. Un dominio variable de inmunoglobulina único de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia.
- 10 3. Un dominio variable de inmunoglobulina único para su uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dominio variable de inmunoglobulina único está presente como una infusión o conjugado con moléculas adicionales seleccionadas de: un dominio variable de inmunoglobulina único o proteína o polipéptido o fragmento de los mismos adicional que puede ser una prolongación de la semividua oes un agente terapéutico o molécula activa adicional, una molécula de PEG, un anticuerpo o un fragment del mismo o una región Fc.
- 15 4. Un dominio variable de inmunoglobulina único para su uso en terapia de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que el dominio variable de inmunoglobulina único está unido a un dominio emparejado VH/VL como una molécula mAbAb, o una fusión en línea.
- 20 5. Un dominio variable de inmunoglobulina único para su uso en terapia de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, para su uso en el tratamiento o la prevención de al menos una enfermedad o trastorno o afección seleccionada de: una enfermedad o trastorno inflamatorio, o una enfermedad o trastorno respiratorio o una enfermedad o trastorno pulmonar.
- 25 6. Un dominio variable de inmunoglobulina único para su uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 2-4, en el que dicho uso es para tratar o prevenir al menos una enfermedad o trastorno o afección que se selecciona de: artritis, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo) enfermedad de Crohn y colitis ulcerante; o por ejemplo enfermedades o trastornos respiratorios o pulmonares, por ejemplo seleccionados entre: asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, bronquitis obstructiva crónica y enfisema, inflamación pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, neumonía, neumonitis hipersensitiva, infiltrado pulmonar con eosinofilia, enfermedad pulmonar ambiental, neumonía, bronquiectasia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, tromboembolismo pulmonar, trastornos de la pleura, trastornos del mediastino, trastornos del diafragma, hipoventilación, hiperventilación, apnea del sueño, síndrome de dificultad respiratoria aguda, mesotelioma, sarcoma, rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped, cáncer de pulmón, rinitis alérgica, alergia, asbestosis, aspergiloma, aspergilosis, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, neumonía eosinófila, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de neumococos invasiva, gripe, micobacterias no tuberculosas, efusión pleural, neumoconiosis, neumoconiosis, neumonía, actinomicosis pulmonar, proteinosis pulmonar alveolar, carbunco pulmonar, edema pulmonar, embolia pulmonar, inflamación pulmonar, hictiocitosis pulmonar X, hipertensión pulmonar, nocardiosis pulmonar, tuberculosis pulmonar, enfermedad venooclusiva pulmonar, enfermedad pulmonar reumatoide, sarcoidosis y granulomatosis de Wegener y lesión pulmonar aguda y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda.
- 30 7. Un dominio variable de inmunoglobulina único para su uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho dominio tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 16 y se usa para tratar una enfermedad seleccionada de: lesión pulmonar aguda y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda.
- 35 8. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un dominio variable de inmunoglobulina único de acuerdo con la reivindicación 1.
- 40 9. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un dominio variable de inmunoglobulina único de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho ácido nucleico tiene la secuencia de la SEQ ID NO 22.
10. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 o 9.
- 45 11. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 o 9 o el vector de la reivindicación 10.
12. Una composición farmacéutica que comprende un dominio variable de inmunoglobulina único de la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1: Frecuencia de anticuerpos antifármaco preexistentes en sueros de sujetos sanos

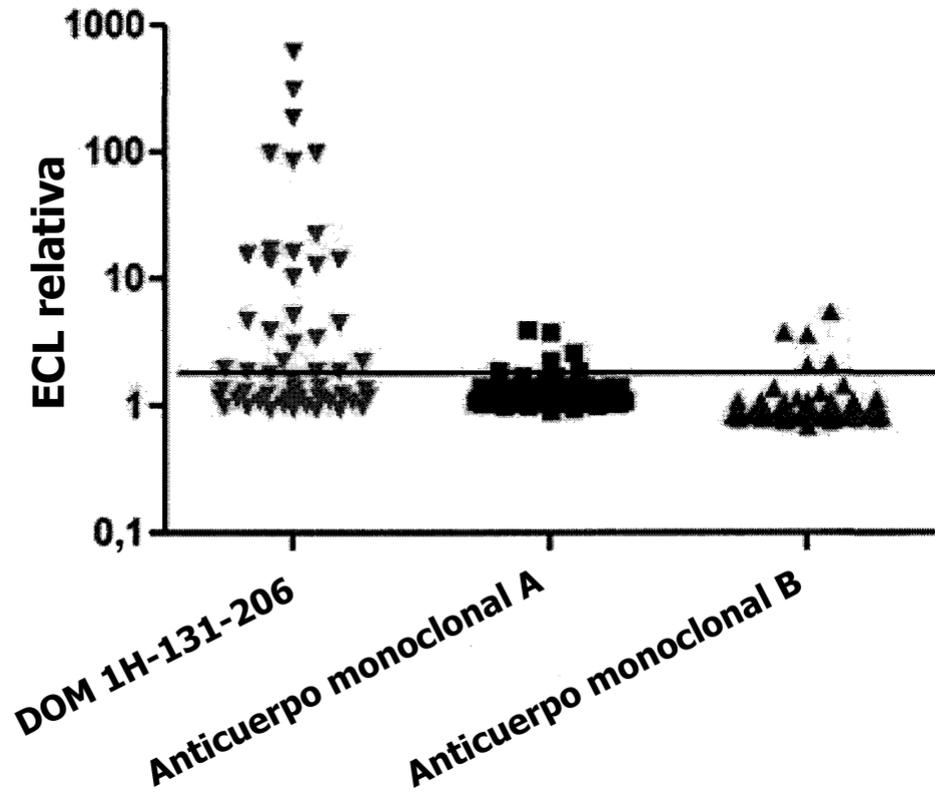


Figura 2: secuencias de aminoácidos de:

- (a) dAb DOM 1H-131-206 (anti-TNFR1) no modificada

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVK  
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLTVVSS **(SEQ ID NO 1)**

- (b) dAb DOM 1H-131-511 (anti-TNFR1) no modificada

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWRQAPGKGLEWVSHIP**V**QDQDPFYADSVK  
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY**Y**CALLPKRGPWFDYWGQGTLTVVSS **(SEQ ID NO 2)**

- (c) dAb DOM 1H-131-202 (anti-TNFR1) no modificada

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVK  
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY**Y**CALLPKRGPWFDYWGQGTLTVVSS **(SEQ ID NO 3)**

- (d) El clon VHH2(d) es un formato biespecífico que tiene un módulo de unión a IL6R enlazado por GGGGSGGGGS a un módulo de unión a albúmina de suero humano tal como se describe en el documento WO2010100135:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMAWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVKGR  
FTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVY**Y**CAFITTESDYDLGRRYWGQGTLTVVSSGGGGSGGGSE  
VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGR  
RFTISRDNAKTLYLQMNSLRPEDTAVY**Y**CTIGGSLSRSSQGTLTVVSS  
**(SEQ ID NO 4)**

- (e) El clon VHH2(e) es un formato biespecífico que tiene un módulo de unión a TNF enlazado a un módulo de unión a albúmina de suero enlazado a su vez a un módulo de unión a TNF, usando GGGGSGGGGS como enlazador tal como se describe en el documento WO2010077422:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK  
GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVY**Y**CARSPSGFNRGQGTLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVE  
SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISR  
DNAKTLTYLQMNSLRPEDTAVY**Y**CTIGGSLSRSSQGTLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ  
PGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRNAKNT  
LYLQMNSLRPEDTAVYCARSPSGFNRGQGTLTVVSS  
**(SEQ ID NO 5)**

Figura 2 continuación:

- (f) El clon VHH2(f) es un formato monoespecífico bivalente que comprende dos módulos idénticos enlazados por medio de un enlazador Ala-Ala-Ala, siendo cada módulo un dAb que puede unirse al dominio A1 del factor de Von-Willebrand, tal como se muestra en el documento WO2009115614A2:

GRFTISRDNKRMYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAA  
 AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRGGSTYYPDSV  
 EGRFTISRDNKRMYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS  
**(SEQ ID NO 6)**

- (g) El clon VHH2(d) es un formato biespecífico que tiene un módulo de unión a IL6R enlazado por medio de GGGGSGGGS a un módulo de albúmina de suero humano tal como se describe en el documento WO2010100135 con una extensión de alanina:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVKGR  
 FTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSE  
 VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGR  
 RFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGQTLVTVSSA  
**(SEQ ID NO 7)**

- (h) El clon VHH2(e) es un formato bispecífico que tiene un módulo de unión a TNF enlazado a un módulo de albúmina de suero enlazado a su vez a un módulo de unión a TNF, usando GGGGSGGGS como enlazador tal como se describe en el documento WO2010077422 con una extensión de alanina:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK  
 GRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE  
 SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISR  
 DNKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ  
 PGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNT  
 LYLQMNLSRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSSA  
**(SEQ ID NO 8)**

- (i) El clon VHH2(f) es un formato monoespecífico bivalente que comprende dos módulos idénticos enlazados por un enlazador Ala-Ala-Ala, siendo cada módulo un dAb que puede unirse al dominio A1 del factor de Von-Willebrand tal como se muestra en el documento WO2009115614A2 con una extensión de alanina:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRGGSTYYPDSVE  
 GRFTISRDNKRMYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAA  
 AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRGGSTYYPDSV  
 EGRFTISRDNKRMYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSA  
**(SEQ ID NO 9)**

Figura 2 continuación:

(j) DOM 1H-574-208

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRITYAHAV  
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVWPFYWGQGLTVTVSS

**(SEQ ID NO 10)**

(k) Fusión DOM 1H-574-208-VL fusión:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRITYAHAV  
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVWPFYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQS  
PSSLSASVGDRTTTCRASRPIGTTLSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGGTDFLT  
ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

**(SEQ ID NO 11)**

(l) DT04-H-033 (dAb IL-13 dAb parental):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYGMWVRQAPGKGLEWVSTISYNGLYTYADSVK  
GRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYEYSPESDFDYWGQGLTVTVSS

**(SEQ ID NO 12)**

(m) DOM10H-53-567

GVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFAWYDMGWVRQAPGKGLEWVSSIDWHGEVITYADS  
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATAEPEPGYDYWGQGLTVTVSS

**(SEQ ID NO 13)**

Figura 3:

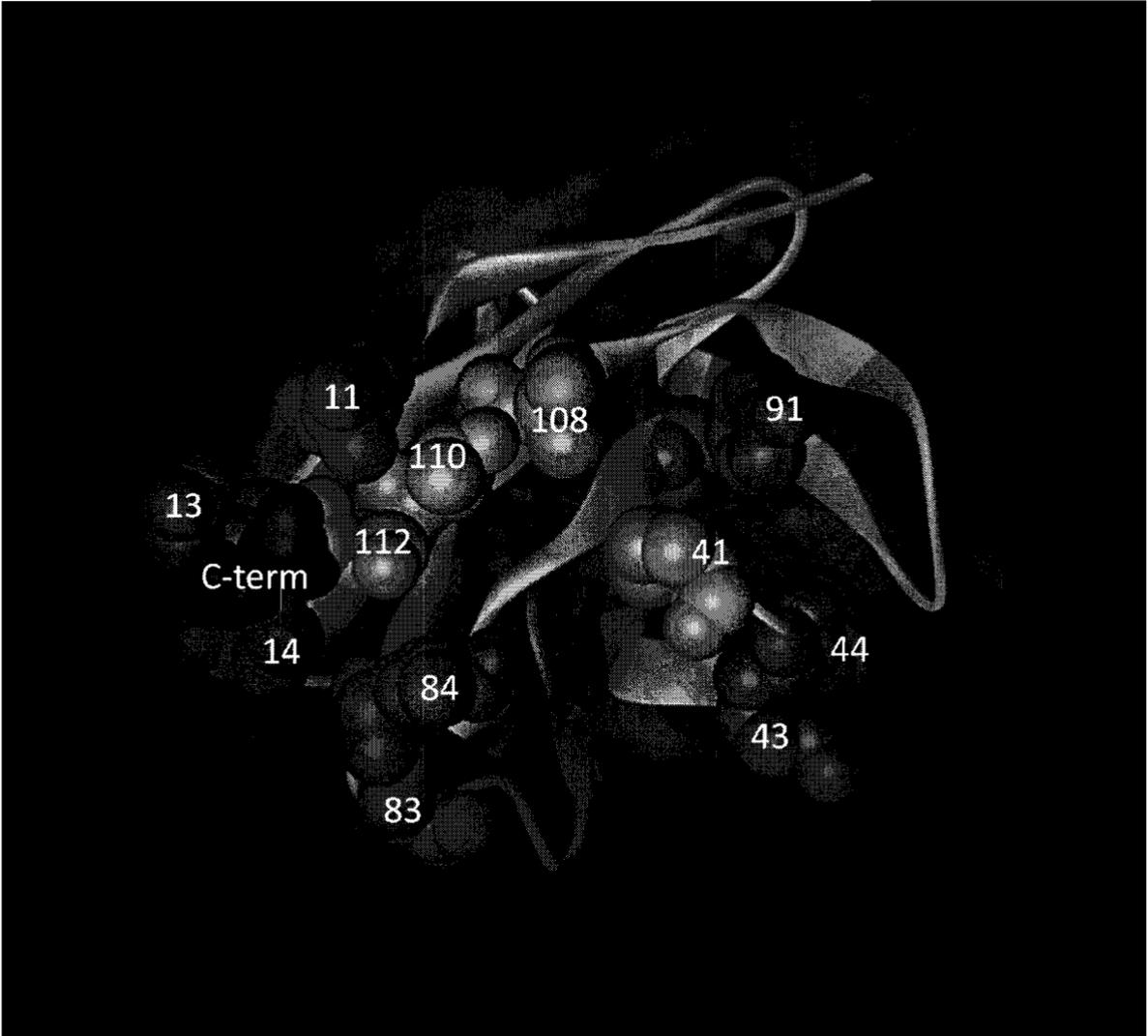


Figura 4: Efecto de extensiones de sólo una alanina en clones de VHH

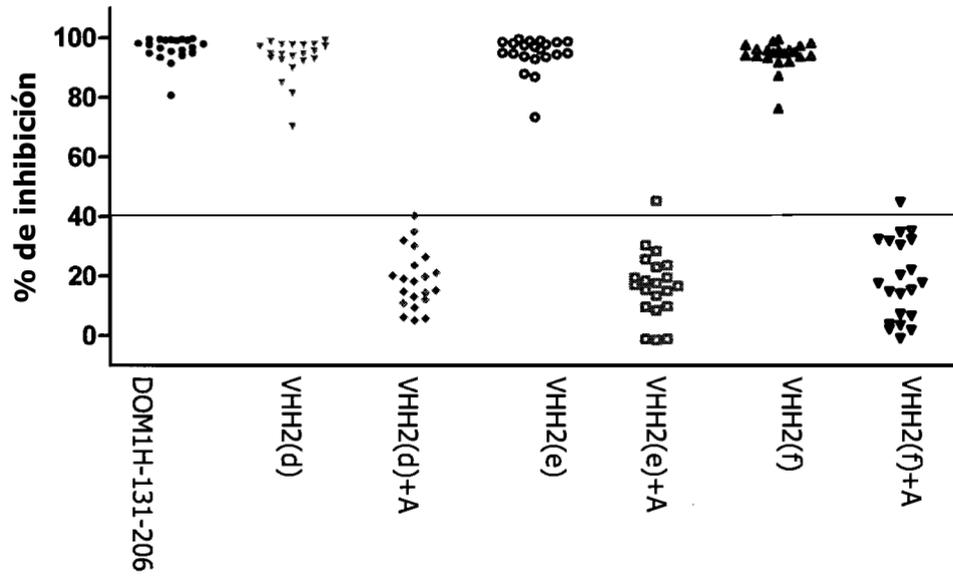


Figura 5: Incidencia de unión a ADA: Dom131-206 a continuación se refiere al dAb Dom1h-131-206

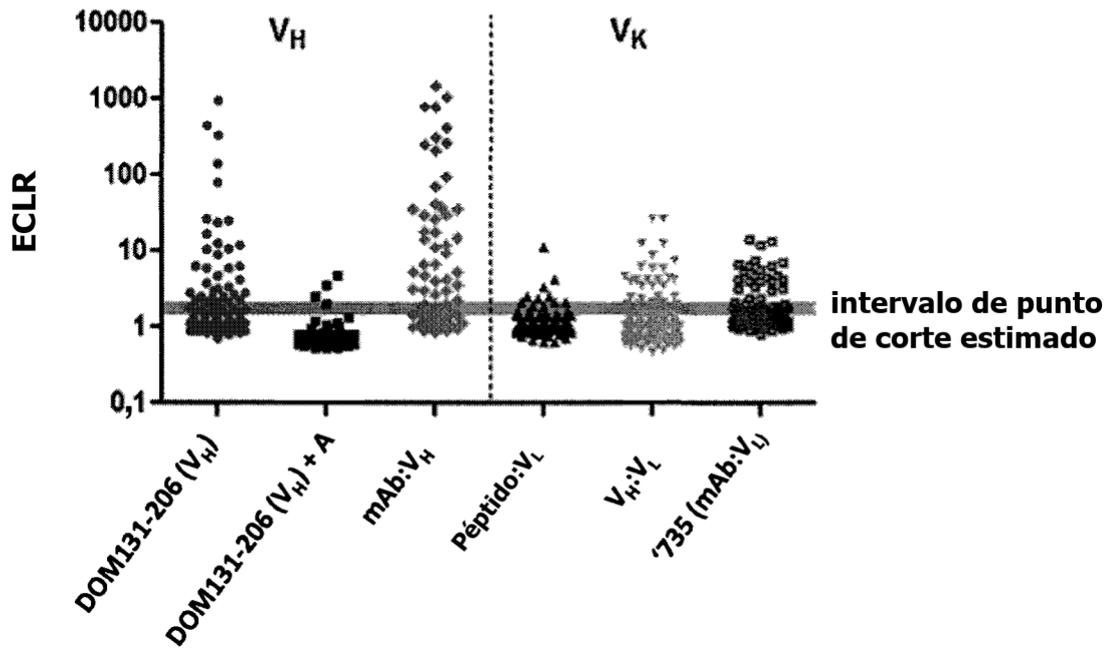


Figura 6a y 6b: Secuencias variables de cadena ligera y pesada de mAb anti-VH M2.3G10.1G06 (las regiones CDR están subrayadas):

(a) Cadena ligera

DIVMTQSQKFMSPTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDF  
TLTINMQSEDLADYFCQOYGSYPLTFGGGTKLEIK

**(SEQ ID NO 14)**

(b) Cadena pesada

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTESYMHVVKQSHGKSLEWIGVISPYNGGTSYNQKFKDKATLT  
VDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCTRRGIYYDPSWFAYWGQGLTVTSA

**(SEQ ID NO 15)**

Figura 7: Competencia entre ADA anti-VH preexistente y mAb M2.3G10.1G06

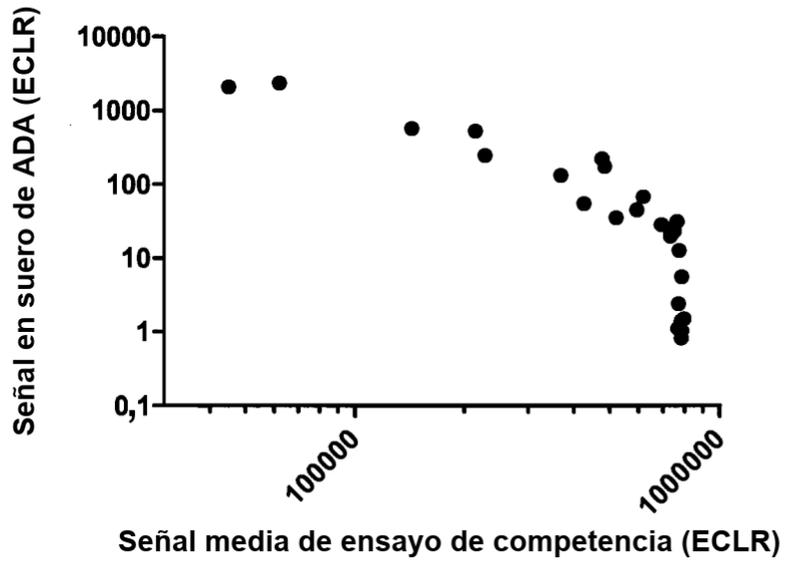


Figura 8: muestra las secuencias de aminoácidos de dAb anti-TNFR1 modificados:

(a) DOM1h-131-206 dAb con una extensión de sólo una alanina:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTIS  
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSSA  
**(SEQ ID NO 16)**

(b) DOM1h-131-206 dAb con una extensión de sólo una alanina y una mutación estructural P14A

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTIS  
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSSA  
**(SEQ ID NO 17)**

(c) DOM1h-131-206 dAb con una sustitución estructural P14A

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTIS  
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSS  
**(SEQ ID NO 18)**

(d) DOM1h-131-206 dAb con una extensión ASTKG C terminal

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTIS  
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSSASTKG  
**(SEQ ID NO 19)**

(e) DOM1h-131-206 dAb con una extensión ASTKG C terminal y una mutación estructural P14A

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTIS  
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSSASTKG  
**(SEQ ID NO 20)**

Figura 9: muestra las secuencias de ácidos nucleicos de dAb TNFR1

(a) dAb DOM1h-131-206

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCTGCGCCTGTCCTGTGCG  
GCATCTGGTTTACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTTCGCCAAGCTCCGGGCAAAGGCCTGGAA  
TGGGTAAGCCACATTCCCTCCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTTACCA  
TTTCTCGTGATAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGT  
GTACCATTGTGCGCTGCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCAC  
CGTAAGCAGC

**(SEQ ID NO 21)**

(b) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de sólo una alanina

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCTGCGCCTGTCCTGTGCG  
GCATCTGGTTTACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTTCGCCAAGCTCCGGGCAAAGGCCTGGAA  
TGGGTAAGCCACATTCCCTCCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTTACCA  
TTTCTCGTGATAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGT  
GTACCATTGTGCGCTGCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCAC  
CGTAAGCAGCGCG

**(SEQ ID NO 22)**

(c) dAb DOM1h-131-206 con una extensión de ASTKG en el extremo C

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCTGCGCCTGTCCTGTGCG  
GCATCTGGTTTACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTTCGCCAAGCTCCGGGCAAAGGCCTGGAA  
TGGGTAAGCCACATTCCCTCCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTTACCA  
TTTCTCGTGATAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGT  
GTACCATTGTGCGCTGCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCAC  
CGTAAGCAGCGCGTCTACCAAAGGT

**(SEQ ID NO 23)**

Figura 10: muestra las secuencias de ácidos nucleicos de moléculas VHH:

(a) VHH anti-IL6

GAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCGCA  
 GCGTCTGGTAGCGTTTTCAAATCAACGTGATGGCGTGGTATCGTCAGGCTCCGGGTAAAGGTCGTGAA  
 CTGGTTGCGGGTATCATTCTGGCGGTAGCACTTCTACGCGGACTCCGTTAAAGGTCGTTTACCATCA  
 GCCGCGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTA  
 CTATTGCGCGTTCATCACCACCGAATCTGACTACGACCTGGGTGCTCGTTATTGGGGTCAGGGTACTCTG  
 GTAACCGTATCCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTTCGAAGTACAGCTGGTGGAATCTGGCGGT  
 GGTCTGGTACAGCCGGTAACTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGTTTACCTTCTCCAGCTTCG  
 GTATGCTTGGGTTCTGTCAGGCACCGGTAAAGGTCGGAATGGGTGCTAGCATCTCTGGCAGCGTT  
 CTGATACCTGTACGCTGACTCCGTGAAAGGTCGTTTCACTATCTCCCGCGACAACGCGAAAACACCCT  
 GTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCACCATCGGTGGTAGCCTG  
 TCCCGTTCTTCTCAGGGTACCCTGGTACTGTGAGCTCT

**(SEQ ID NO 24)**

(b) alfa VHH anti-TNF

GAAGTGCAGCTGGTAGAATCTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCGCA  
 GCTTCTGGCTTACCTTCTCCGACTACTGGATGTATTGGGTTCTGTCAGGCGCCGGGTAAAGGTCGGAA  
 TGGGTGTCTGAAATCAACACCAACGGCCTGATCACCAAATACCCGACTCCGTGAAAGGTCGTTTACCA  
 TCTCCCGCGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGT  
 TTAATATTGTGCGCGTTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTTCAGGGTACTCTGGTTACCGTAAGCTCTGGT  
 GGTGGTGGATCCGGCGGTGGTCTGAAGTTCAGCTGGTGAAGCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGG  
 TAACTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGCTTACCTTCTCTCTTTCGGTATGTCTTGGGTTCTG  
 CAGGCACCGGGTAAAGGCTGGAATGGGTTTCTCTATCTCTGGTAGCGGTTCTGACACCCTGTACGCT  
 GACTCTGTTAAAGGCCGCTTACCATCTCCCGTGAACAACGCGAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACT  
 CCTGCGTCCGGAAGATACCGCTGTATACTACTGCACCATCGGTGGCTCTCTGTCTCGTTCTTCTCAGGG  
 TACCCTGGTTACCGTATCTAGCGGTGGTGGTGGATCCGGTGGCGGTAGCGAAGTTCAGCTGGTTGAATC  
 TGCGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGAGCGTCTGGCTTACCTTCA  
 CGATTACTGGATGTAAGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCGGAATGGGTGCTGAAATCAACAC  
 CAACGGTCTGATCACCAAATACCCGGACAGCGTGAAGGTCGTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAA  
 AACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGACTGCGGTTTATTACTGCGCACGTTCTC  
 CGTCTGGTTTCAACCGTGGTTCAGGGTACCCTGGTACTGTATCCTCT

**(SEQ ID NO 25)**

(c) VHH anti-Von Willebrand

GAGGTACAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCGC  
 AGTTCTGGCCGTACCTTCAGCTACAACCCGATGGGTTGGTCCGTCAGGCTCCGGGTAAAGGTCGTGA  
 ACTGGTTGCGCGATCTCTGTACCGGTGGCTCTACCTACTATCCGACTCCGTGGAAGGTCGTTTAC  
 CATCTCCCGCGACAACGCGAAACGTATGGTATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGC  
 GGTTTACTATTGTGCTGCAGCGGGTTCGTGCTGAAGACGGTCTGTTCTGTTACCCTGCCGTCCGAATA  
 CACCTTCTGGGGTCAGGGTACCCAGGTACCGTTTCTTCTGCAGCGCGGAAGTGCAGCTGGTTGAATC  
 TGCGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCTGCGTCTGGTTCGACCTTCTC  
 CTACAACCCGATGGGTTGGTCCGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCGTGAACTGGTAGCGGCAATCTCTCG  
 CACTGGTGGCTCTACCTACTACCCGACTCTGTTGAAGGCCGCTTACCATCTCTCGTGACAACGCGAAA  
 CGTATGGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTGCAGGAAGACACCGCAGTTTATTACTGCGCGGCAGCT  
 GGTGTTCTGTCAGAAGACGGTCTGTTCTGTTACCCTGCCGAGCGAATACACCTTCTGGGGTCAGGGTACC  
 CAGGTAACCGTATCTTCT

**(SEQ ID NO 26)**

Figura 10 continuación:

(d) VHH anti-IL6 con una extensión de sólo una alanina

GAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCT  
 TGCGCAGCGTCTGGTAGCGTTTTCAAATCAACGTGATGGCGTGGTATCGTCAGGCTCCGGGTAAAGGT  
 CGTGAACCTGGTTGCGGGTATCATTTCTGGCGGTAGCACTTCTACGCGGACTCCGTTAAAGGTCTGTTT  
 ACCATCAGCCGCGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATACCG  
 CGGTTTACTATTGCGCGTTCATCACCACCGAATCTGACTACGACCTGGGTCGTCGTTATTGGGGTCAGG  
 GTAATCTGGTAACCGTATCCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCCGAAGTACAGCTGGTGGAAAT  
 CTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTAACCTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGTTTACCTTCT  
 CCAGTTCGGTATGTCTTGGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGTCTAGCATCTCTG  
 GCAGCGGTTCTGATACCCTGTACGCTGACTCCGTGAAAGGTCTGTTTCACTATCTCCCGCGACAACGCGAA  
 AACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCACCATCGGT  
 GGTAGCCTGTCCCGTCTTCTCAGGGTACCCTGGTACTGTGAGCTCTGCG

**(SEQ ID NO 27)**

(e) alfa VHH anti-TNF con una extensión de sólo una alanina

GAAGTGCAGCTGGTAGAATCTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCT  
 TGCGCAGCTTCTGGCTTACCTTCTCCGACTACTGGATGTATTGGGTTCTGTCAGGCGCCGGGTAAAGGT  
 CTGGAATGGGTGTCTGAAATCAACACCAACGGCTGATCACCAAATACCCGGACTCCGTGAAAGGTCTGTT  
 TCACCATCTCCCGCGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATAC  
 CGCGGTTTACTATTGTGCGCGTTCCTGCTGGTTTCAACCGTGGTCAGGGTACTCTGGTTACCGTAAG  
 CTCTGGTGGTGGTGGATCCGGCGGTGGTCTGAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTAC  
 AGCCGGGTAACCTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGCTTACCTTCTCCTCTTTCGGTATGTCTTG  
 GGTTCGTCAGGCACCGGGTAAAGGCCCTGGAATGGGTTTCTCTATCTCTGGTAGCGGTTCTGACACCCT  
 GTACGCTGACTCTGTTAAAGGCCGCTTACCATCTCCCGTGAACAACGCGAAAACACCCTGTATCTGCAG  
 ATGAACTCCCTGCGTCCGGAAGATACCGCTGTATACTACTGCACCATCGGTGGCTCTCTGTCTCGTTCTT  
 CTCAGGGTACCCTGGTTACCGTATCTAGCGGTGGTGGTGGATCCGGTGGCGGTAGCGAAGTTCAGCTGG  
 TTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGTCTTGTGAGCGTCTGGCTTCA  
 CCTTCAGCGATTACTGGATGTACTGGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGTCTGAAA  
 TCAACACCAACGGTCTGATCACCAAATACCCGGACAGCGTAAAGGTCTGTTTCAACCATCAGCCGTGACAA  
 CGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGACACTGCGGTTTATTACTGCGCA  
 CGTTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTCAGGGTACCCTGGTACTGTATCCTCTGCG

**(SEQ ID NO 28)**

(f) VHH anti-Von Willebrand con una extensión de sólo una alanina

GAGGTACAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGC  
 AGCTTCTGGCCGTACCTTCTAGCTACAACCCGATGGGTTGGTCCGTCAGGCTCCGGGTAAAGGTCTGTA  
 ACTGGTTGCGGCGATCTCTGATACCGGTGGCTTACCTACTATCCGGACTCCGTGGAAGGTCTGTTTAC  
 CATCTCCCGCGACAACGCGAAACGTATGGTATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGC  
 GGTTACTATTGTGCTGCAGCGGGTTCGTGCTGAAGACGGTCTGTGTTCTGATACCCTGCCGTCCGAATA  
 CACCTTCTGGGGTACGGGTACCCAGGTTACCGTTTCTTCTGACGCGGCGGAAGTGCAGCTGGTTGAATC  
 TGCGGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCTGCGTCTGGTGCACCTTCTC  
 CTACAACCCGATGGGTTGGTCCGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGAACTGGTAGCGGCAATCTCTCG  
 CACTGGTGGCTTACTACTACCCGGACTCTGTTGAAGGCCGCTTACCATCTCTCGTGACAACGCGAAA  
 CGTATGGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTGCAGGAAGACACCGCAGTTTATTACTGCGCGGAGCT  
 GGTGTTCTGTCAGAAGACGGTCTGTTCGTACCCTGCCGAGCGAATACACCTTCTGGGGTACGGGTACC  
 CAGGTAACCGTATCTTCTGCG

**(SEQ ID NO 29)**

Figura 11: secuencias de aminoácidos de dAb mAb:VL

(a) molécula mAb-VL `735 (dAb IL-13mAb: IL-4Vkappa):

(i) secuencia de cadena pesada de la molécula `735

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFYIKDTYMHVWRQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTI  
TADSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHVDYDYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTICRASRP  
ISDWLHWYQQKPKGAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY  
CQQEGWGPPTFGQGTKVEIKR

**(SEQ ID NO 30)**

(ii) secuencia de cadena ligera de la molécula `735

DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQNIHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTD  
FTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK  
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**(SEQ ID NO 31)**

(b) mAb-VL 15014

(i) secuencia de cadena pesada de la molécula 15014

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTIS  
KDTSRNQVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSTDIQMTQSPSSLSASVGDRTTICRASRPISDWLHWYQQK  
GKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQEGWGPPTFGQGTKVEIKRAAA

**(SEQ ID NO 32)**

(ii) secuencia de cadena ligera de la molécula 15014

DIVLTQSPSSLSASVGDRTTICKASQSDYDGD SYMNWYQQKPKGAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGTDF  
TFTISSLQPEDATYYCQNSMEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**(SEQ ID NO 33)**

Figura 11 continuación:

(c) ) mAb-VL 15019

(i) secuencia de cadena pesada (el componente mAb se muestra subrayado, el enlazador se muestra en cursiva, el componente dAb VL sigue al enlazador y se muestra en negrita)

QVTLRESGPALVKPTOTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIROPPGKLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTIS  
KDTSRNQVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK *GSTVAAP* ***S7DIQMTQSPSSLSASVGD*** ***RVTTICRASRPISDWLHW***  
***YQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEGWGPPTF***  
***GQGTKVEIKRT***

**(SEQ ID NO 34)**

(ii) secuencia de cadena L de mAb-VL 15019

DIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSDYDGD SYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGG  
 TDFTFTISSLQPEDIATYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR  
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C

**(SEQ ID NO 35)**

(d) ) mAb-VL 15020

(i) secuencia de cadena pesada (el componente mAb se muestra subrayado, el enlazador se muestra en cursiva, el componente dAb VL sigue al enlazador y se muestra en negrita)

QVTLRESGPALVKPTOTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIROPPGKLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTIS  
KDTSRNQVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK *GSTVAAP* ***S7DIQMTQSPSSLSASVGD*** ***RVTTICRASRPISDWLHW***  
***YQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEGWGPPTF***  
***GQGTKVEIKRTV***

**(SEQ ID NO 36)**

Figura 11 continuación:

(d ii) secuencia de cadena L de mAb-VL 15020

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSG  
TDFTFTISSLQPEDIATYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPR  
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C

**(SEQ ID NO 37)**

(e ) mAb-VL 15021

(i) secuencia de cadena pesada (el componente mAb se muestra subrayado, el enlazador se muestra en cursiva, el componente dAb VL sigue al enlazador y se muestra en negrita)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTIS  
KDTSRNOVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWFYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGLKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK *GSTVAAP***S7DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHW**  
**YQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEGWGPPTF**  
**GQGTKVEIK**

**(SEQ ID NO 38)**

(ii) secuencia de cadena L de mAb-VL 15021

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGT  
DFTFTISSLQPEDIATYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**(SEQ ID NO 39)**

Figura 12: secuencias de aminoácidos de moléculas dAb-fc-dAb-Vh-Vk

(a) DMS30045: dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal ((TGLDSP)x4

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISRDN  
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
 NKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMT  
 QSPSSLSASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF  
 ATYYCQQYMYYPHTFGQGTKVEIKR

**(SEQ ID NO 40)**

(b) DMS30046: dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISRDN  
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLS  
 ASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ  
 YMYYPHTFGQGTKVEIKR

**(SEQ ID NO 41)**

(c) DMS30047 (contiene extremo C modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK)  
 y dAb K-044-085 C-terminal menos R en el extremo C ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
 TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF  
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
 PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSP  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL  
 QPEDFATYYCQQYMYYPHTFGQGTKVEIK

**(SEQ ID NO 42)**

Figura 12 continuación:

(d) DMS30048 (contiene extremo C modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + A ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSP  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL  
QPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKVEIKRA

**(SEQ ID NO 43)**

(e) DMS30049 (contiene extremo C modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + AAA ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSP  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL  
QPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKVEIKRAAA

**(SEQ ID NO 44)**

(f) DMS30050 (contiene extremo C modificado): dAb DOM15-26-597 N-(enlazador VEPKSSDK) y dAb K-044-085 C-terminal + T ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSP  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL  
QPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKVEIKRT

**(SEQ ID NO 45)**

Figura 12 continuación:

(g) DMS30051 (contiene extremo C modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal menos R C-terminal ((TGLDSP)x4))

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
 TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSASTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
 NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMT  
 QSPSSLSASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF  
 ATYYCQQYMYYPHTFGQGTKVEIK

**(SEQ ID NO 46)**

(h) DMS30052 (contiene extremo C modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal + A ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
 TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSASTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
 NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMT  
 QSPSSLSASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF  
 ATYYCQQYMYYPHTFGQGTKVEIKRA

**(SEQ ID NO 47)**

(i) DMS30053 (contiene extremo C modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal + AAA ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
 TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLTVTVSSASTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
 NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMT  
 QSPSSLSASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF  
 ATYYCQQYMYYPHTFGQGTKVEIKRAAA

**(SEQ ID NO 48)**

Figura 12 continuación:

(j) DMS30054 (contiene extremo C modificado): dAb DMS1576 con K-044-085 C-terminal + T  
((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGLVTVSSASTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS  
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLD  
QSPSSLSASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPKGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDF  
ATYYCQYMYYPHTFGQGTKVEIKRT

**(SEQ ID NO 49)**