SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-056244- -00000-0000
Fecha: 2012-04-03 17:15:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 571
Act. 411 PRESENTACION Folios: 571

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: MOLECULAS DE UNIÓN BIESPECÍFICAS PARA LA TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

DIRECCIÓN: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein Alemania

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 03 de Abril de 2012

P2012/000030

OLARTEMC
OLARTE MOURE & ASOCIA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-056244- -00000-0000
Fecha: 2012-04-03 17:15:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 571

Act. 411 PRESENTACION Folios: 571

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL P2012/000030

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
Dirección: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein
Nacionalidad o Domicilio: Alemania
Lugar de Constitución: Alemania
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/064695 Fecha Octubre 1, 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/039370 Fecha Abril 7, 2011

(6) Título (54) MOLECULAS DE UNIÓN BIESPECÍFICAS PARA LA TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28; A61P 35/00; C07K 16/22; C07K 16/18

Prioridad SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
EP	Octubre 2, 2009	09172137.3
EP	Septiembre 3, 2010	10175316.8

(9) Comprobante de pago No. 12- **Fecha** Abril de 2012

1

(10) **ANEXOS**

[x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

[x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

[x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 11-009.242

[ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.

[ ] Declaraciones.

[x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

[x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

[ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

[ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

[ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.

[ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

[ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

[ ] Arte final 12 x 12.

[ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

[X] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

[x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2010/064695

BORGES, Eric;
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents, Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

GSCHWIND, Andreas;
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents, Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

BOUCNEAU, Joachim;
Salviapark 1 bus 1
B-940 De Pinte
Belgica
Nacionalidad: Belga

DE TAVERNIER, Evelyn;
Molenberglaan 38, B-900 Beervelde
Belgica
Nacionalidad: Belga

KOLKMAN, Joost;
Voetweg 13, B-930 Sint-Martens-Latem
Belgica
Nacionalidad: Holandesa

MERCHIERS, Pascal;
Loopstraat 23,
B-2460 Kasterlee
Belgica
Nacionalidad: Belga

VAN HOORICK, Diane;
Warande 118, B-9270
Laarne
Belgica
Nacionalidad: Belga

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033150

Bogotá D.C., Abril 03 de 2012 - 10:45:41

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455531716	02/04/2012	3.540.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-056244- -00000-0000

Fecha: 2012-04-03 17:15:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 571

TESTIMONIO

ESCRITURA: 001416
MINUTA: 000657

K: 007735

DELEGACION DE PODER
QUE OTORGA
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
REPRESENTADO POR
JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS
A FAVOR DE
CARLOS REINALDO OLARTE

&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&

INTRODUCCION ==

EN LA CIUDAD DE LIMA AL VEINTISEIS DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, ANTE MI; MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA, NOTARIO DE ESTA CAPITAL. ==

COMPARECEN: ==

JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS, QUIEN MANIFIESTA SER DE NACIONALIDAD: PERUANA, DE ESTADO CIVIL CASADA, DE PROFESION U OCUPACIÓN: ABOGADA Y DOMICILIAR EN AVENIDA REPUBLICA DE PANAMA 3531, OFICINA 1203, DISTRITO DE SAN ISIDRO PROVINCIA Y DEPARTAMENTO DE LIMA, DEBIDAMENTE IDENTIFICADA CON DOCUMENTO NACIONAL DE IDENTIDAD NUMERO 29562321, QUIEN PROCEDE EN REPRESENTACION DE **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**, CUYAS FACULTADES CONSTAN EN EL PODER OTORGADO CON FECHA QUINCE DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, DEBIDAMENTE LEGALIZADO POR EL MINISTERIO DE RELACIONES ESTERIORES CON FECHA VEINTITRES DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, QUE SE INSERTA. ==== LA COMPARECIENTE ES INTELIGENTE EN EL IDIOMA CASTELLANO, QUIEN SE OBLIGA CON CAPACIDAD, LIBERTAD Y CONOCIMIENTO SUFICIENTE DE CONFORMIDAD CON EL EXAMEN QUE LE HE EFECTUADO DE LO QUE DOY FE; Y ME ENTREGO UNA MINUTA QUE ARCHIVO EN SU LEGAJO RESPECTIVO BAJO EL NUMERO DE ORDEN CORRESPONDIENTE Y CUYO TENOR LITERAL ES COMO SIGUE: ==

MINUTA: ==

SEÑOR NOTARIO: ==

SÍRVASE EXTENDER EN SU REGISTRO DE ESCRITURAS PÚBLICAS UNA DE **DELEGACION DE PODER** QUE OTORGA LA SEÑORA **IVETTE LUQUE CARDENAS**, IDENTIFICADA CON DNI N° 29562321, DE NACIONALIDAD PERUANA, ESTADO CIVIL CASADA, OCUPACIÓN ABOGADO Y CON DOMICILIO EN AV. REPÚBLICA DE PANAMÁ N° 3531, OFICINA 1203, SAN ISIDRO, QUIEN ACTÚA EN REPRESENTACIÓN DE **BOEHRINGER INGELHEIM** INTERNATIONAL GMBH, UNA EMPRESA CONSTITUIDA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE ALEMANIA, CON DOMICILIO EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, ALEMANIA, SEGÚN PODER OTORGADO CON FECHA 13 DE OCTUBRE DE 2009, Y A QUIEN EN ADELANTE SE LE DENOMINARÁ **EL PODERDANTE**; A FAVOR DEL SEÑOR **CARLOS REINALDO OLARTE**, IDENTIFICADO CON CÉDULA N° 79.782.747, A QUIEN EN ADELANTE SE LE DENOMINARÁ **EL APODERADO**; EN LOS SIGUIENTES TÉRMINOS Y CONDICIONES: ==

PRIMERO: CON FECHA 15 DE JULIO DE 2010, LA EMPRESA BOEHRINGER **INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**, UNA EMPRESA CONSTITUIDA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE ALEMANIA, CON DOMICILIO EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, ALEMANIA, OTORGÓ PODER A FAVOR DE EL PODERDANTE, EL CUAL USTED SEÑOR NOTARIO SE SERVIRÁ INSERTAR. ==

SEGUNDO: POR EL PRESENTE DOCUMENTO, EL PODERDANTE DELEGA PODER A FAVOR DE **EL APODERADO** PARA QUE REPRESENTE EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA A LA SOCIEDAD BOEHRINGER **INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**, TAL COMO CONSTA EN EL PODER ADJUNTO, ANTE CUALQUIER AUTORIDAD ADMINISTRATIVA O JUDICIAL, INCLUYENDO LA SECRETARÍA Y TRIBUNAL DE JUSTICIA DE LA COMUNIDAD ANDINA, PARA EL INICIO, TRAMITACIÓN, OBTENCIÓN, DEFENSA Y HACER RESPETAR TODAS Y CUALQUIERA DE LAS PATENTES DE INVENCIÓN, MODELOS DE UTILIDAD, DISEÑOS INDUSTRIALES, MARCAS, LEMAS COMERCIALES, NOMBRES COMERCIALES, PROTECCIÓN DE DATOS DE PRUEBA, PROTECCIÓN DE SECRETOS EMPRESARIALES, DERECHOS DE AUTOR, REGISTRO DE NOMBRES DE DOMINIO, O SEGUIMIENTO DE PROCEDIMIENTOS EN MATERIAS TALES COMO PROPIEDAD INTELECTUAL. ==

4

TESTIMONIO

EL APODERADO ACTUANDO EN FORMA INDIVIDUAL PODRÁ DEMANDAR, RECONVENIR, CONTESTAR DEMANDAS Y RECONVENCIONES, PRESENTAR TODO TIPO DE SOLICITUDES, RECURSOS, RESPUESTAS U OPOSICIONES, PRESENTAR TODO TIPO DE RECURSOS DE IMPUGNACIÓN, PRESENTAR DECLARACIONES, JURADAS O NO, PRESENTAR CUALQUIER OTRO RECURSO O REMEDIO PROCESAL PERMITIDO POR LEY, PAGAR IMPUESTOS Y ANUALIDADES, SOLICITAR TESTIMONIOS, RENUNCIAR A LOS DERECHOS DE REGISTRO SOBRE UN ELEMENTO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL, DESISTIRSE DEL PROCESO Y DE LA PRETENSIÓN, ALLANARSE A LA PRETENSIÓN, CONCILIAR, TRANSIGIR, SOMETER A ARBITRAJE LAS PRETENSIONES CONTROVERTIDAS EN EL PROCESO, SOLICITAR Y EJECUTAR MEDIDAS CAUTELARES ASÍ COMO VISITAS INSPECTIVAS, RATIFICAR LOS ACTOS JURÍDICOS PROCESALES SUSCRITOS CON ANTERIORIDAD AL OTORGAMIENTO Y/O PRESENTACIÓN DEL PRESENTE PODER, SUSTITUIR O DELEGAR LA REPRESENTACIÓN, REVOCAR LOS PODERES OTORGADOS, RECIBIR NOTIFICACIONES EN NOMBRE DE LA COMPAÑÍA Y LOS DEMÁS ACTOS QUE EXPRESE LA LEY. ==========

AGREGUE USTED SEÑOR NOTARIO, LAS CLÁUSULAS DE LEY, E INSERTE EL PODER AL QUE SE HA HECHO REFERENCIA. =======

LIMA, 21 DE JULIO DE 2010. ==========

FIRMADO.- UNA FIRMA ILEGIBLE.- ==========

ABOGADO QUE AUTORIZA.- UN SELLO QUE DICE.- JURGEN STROBACH FLORIAN.- ABOGADO.- C.A.L: 30548.- UNA FIRMA ILEGIBLE.-

INSERTO UNO: TRADUCCION OFICIAL ==========

MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA, ABOGADO NOTARIO DE LIMA, CERTIFICO QUE HE TENIDO A LA VISTA LA **TRADUCCION OFICIAL DEL PODER ESPECIAL,** DEBIDAMENTE LEGALIZADO POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES CON FECHA VEINTITRES DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, CUYO TENOR LITERAL ES COMO SIGUE: ==========

TRADUCCIÓN OFICIAL

TRA. N° TOI.0077.10

Primera página del documento original:

PODER ESPECIAL de fecha 15 de julio de 2010 redactado en idioma castellano e inglés

Segunda página del documento original:

UR. Nr: 1446/2010

Por la presente se certifica que las firmas que anteceden de:

- Dr. Michael Kompter, nacido el 11 de mayo de 1955, con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173.
- Dr. Christian Hanke, nacido el 31 de agosto de 1947, con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173.

a quienes he conocido en persona,
han sido estampadas en mi presencia

Asimismo, certifico que Boehringer Ingelheim International GmbH es una sociedad debidamente constituida bajo las leyes de la República Federal de

Mary Ann Hondaguito Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro N° 1195

Estados Unidos 858 - Lima 11 - Perú - Telfs.: (511) 460-1659 • (511) 463-1167 • Fax: (511) 463-4545
maenlim@terra.com.pe

6

TESTIMONIO

TRA. N° TOI.0077.10

Alemania, con domicilio en Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Alemania.

Dicha sociedad se encuentra inscrita en el Registro Mercantil del Juzgado de Distrito de Bingen, bajo el número HR B 1063 desde el 14 de mayo de 1968. Dicha inscripción ha sido transferida por ley al Registro Mercantil del Juzgado de Distrito de Mainz, donde se encuentra inscrita bajo el número HR B 21063 desde el 28 de diciembre de 2005.

Asimismo, certifico que los doctores Michael Kompter y Christian Hauke, han sido autorizados para firmar el documento que antecede y actualmente se encuentran debidamente autorizados para firmar a nombre de Boehringer Ingelheim International GmbH en calidad de apoderados.

Ingelheim am Rhein, 15 de julio de 2010

(firmado ilegible)

Notario Público

Mary Ann Monteagudo Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro N° 1705

Estados Unidos 588 - Lima 11 - Perú - Telfs. (511) 460-1059 • (511) 463-1107 • Fax (511) 463-4548
megmm@terra.com.pe

ARCHIVO DEL NOTARIO DE LIMA

TESTIMONIO

TRA. N° TOI.0077.10

Reverso de la segunda página del documento original:

(sello en idioma extranjero distinto al inglés, de fecha 16 de julio de 2010)

(sello en idioma castellano del Consulado del Perú, de fecha 20 de julio de 2010)

(sello) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR

Legalización N° 092720

Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a) Alfredo Arecco-Sablich sin juzgar el contenido del documento

Lima, 23 de julio de 2010

(fdo.) Maribel del Rosario LUYO JAVIER

Departamento de Legalizaciones

Dirección de Trámites Consulares/sello

La infrascrita, Traductora Pública Juramentada, certifica que la presente traducción es fiel y correcta del texto original en idioma Castellano..... adjunto. Esta traducción no debe interpretarse como reconocimiento de la autenticidad del documento traducido.
En fe de lo cual, firmo y sello en.....Lima.....
a los...26.....días del mes de...julio.....de 2010.

Mary Ann Montesgudo Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro JVT N° 105

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización Nº
Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)

SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

Julia Adela Moreano de Dueñas
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares
LIMA 27 JUL 2010

Estados Unidos 888 - Lima 11 - Perú - Telfs. (511) 460-1659 • (511) 463-1167 • Fax: (511) 463-4648
maamm@terra.com.pe

TESTIMONIO

FERNÁNDEZ - DÁVILA & BUENO
ABOGADOS

PODER ESPECIAL

Consta por el presente documento el Poder Especial que otorga *[insertar nombre de poderdante]*, domiciliada en *[insertar domicilio]* constituida de acuerdo a las leyes de *[insertar país de constitución]*, representada por su *[insertar cargo en la cía.]* Sr.(a) *[insertar nombre del representante de la cía.]*, a favor de FERNÁNDEZ-DÁVILA ABOGADOS SAC, CARLOS FERNÁNDEZ DAVILA WINKLER, ROSA BUENO MERA, JULIETA DEL PILAR TIJERO MARTINO, DIEGO CORDOVA FLORES, IVETTE LUQUE CARDENAS y/o CLARISA SILES VASCONES, domiciliados en Av. República de Panamá 3531, Oficina 1203, San Isidro, Lima, Perú, para que la representen en la República de Perú, República de Bolivia, República de Chile, República de Colombia, República de Ecuador y República Bolivariana de Venezuela, ante cualquier autoridad administrativa o judicial, incluyendo la Secretaría y Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, para el inicio, tramitación, obtención, defensa y hacer respetar todas y cualquiera de las patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas, lemas comerciales, nombres comerciales, protección de datos de prueba, protección de secretos empresariales, derechos de autor, registro de nombres de dominio, o seguimiento de procedimientos en materias tales como Propiedad Intelectual.

Los apoderados podrán ejercer el presente poder actuando en forma individual e indistinta, y gozarán de las siguientes facultades, tales como demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones, presentar todo tipo de solicitudes, recursos, respuestas u oposiciones, presentar todo tipo de recursos de impugnación, presentar declaraciones, juradas o no; presentar cualquier otro recurso o remedio procesal permitido por ley, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios renunciar a los derechos de registro sobre un elemento de la propiedad industrial, desistirse del proceso y de la pretensión, allanarse a la pretensión, conciliar, transigir, someter a arbitraje las pretensiones controvertidas en el proceso, solicitar y ejecutar medidas cautelares así como visitas inspectivas, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación de presente poder, sustituir o delegar la representación procesal, revocar los poderes otorgados, recibir notificaciones en nombre de la compañía y los demás actos que exprese la ley.

Suscrito en ..... el ..... de ..... de 2010

ESTE PODER REQUIERE DE LEGALIZACIÓN NOTARIAL (PRECISANDO QUE EL REPRESENTANTE TIENE LAS FACULTADES PARA OTORGARLO Y QUE ESTUVO PRESENTE AL MOMENTO DE HACERLO) Y DE CONSUL PERUANO (CUANDO ES OTORGADO EN EL EXTRANJERO)

SPECIAL POWER OF ATTORNEY

By means of this Special Power of Attorney *Boehringer Ingelheim International GmbH* with address in *Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany* and incorporated under the laws of *Germany* duly represented by its *Authorized Signatories* Dr. Michael KOMPTER and Dr. Christian HAUKE, grants to FERNÁNDEZ-DÁVILA ABOGADOS SAC, CARLOS FERNÁNDEZ DAVILA WINKLER, ROSA BUENO MERA, JULIETA DEL PILAR TIJERO MARTINO, DIEGO CORDOVA FLORES, IVETTE LUQUE CARDENAS and/or CLARISA SILES VASCONES, with address at Av. República de Panamá 3531, Oficina 1203, San Isidro, Lima, Perú, the powers to represent in the Republic of Perú, the Republic of Bolivia, Republic of Chile, Republic of Colombia, Republic of Ecuador and the Bolivarian Republic of Venezuela before any administrative or judicial authority of any class, including the Andean Secretariat and the Andean Court of Justice to initiate, prosecution, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Invention, Utility Models, Industrial Designs, Trademarks, Trade Names, Commercial Emblems, Test Data Protection, Protection of Trade Secrets, Copyrights, Registration of Domain names and handle proceedings related to Intellectual Property.

The empowered representatives will exert this power of attorney acting individually and indistinctively with the following powers, having authority to claim, to counter-claim, to answer complaints and counter-claims, to file petitions, recourses, replies and oppositions, to withdraw the registration of an industrial property element, to abandon the action and the requested relief, to defend a suit, to file all sort of petitions, appeal and motions permitted by law, pay taxes and annuities, request testimonies, to accept in total or part the demanded pretensions, conciliate, settle, submit to arbitration the contradicted pretensions in the process, to require and execute precautionary measures and inspections among others, to ratify all the acts in regular procedures and proceedings entered into before the granting and/or presentation of this document, substitute or delegate the representation, revoke such substitutions, receive notifications on behalf of the Company and for the rest of the acts which the law provides.

Executed in Ingelheim, on 15th July of 2010

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

ppa.
Dr. Michael KOMPTER
Authorized Signatory

ppa.
Dr. Christian HAUKE
Authorized Signatory

THIS POWER OF ATTORNEY REQUIRES LEGALIZATION OF A NOTARY (STATING THAT THE REPRESENTATIVE HAS ENOUGH POWERS TO GRANT IT AND APPEARED AND EXECUTED IT PERSONALLY) AND OF A PERUVIAN CONSUL (WHEN GRANTED ABROAD)

TESTIMONIO

UR.Nr. 1446/2010

It is herewith certified that above signatures of:

- Dr. Michael **K o m p t e r**, born 11th day of May 1955, with its business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,
- Dr. Christian **H a u k e**, born 31st day of August 1947, with its business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

personally known,
were duly given in my presence.

It is herewith certified that **Boehringer Ingelheim International GmbH** is a corporation duly organized and existing under the laws of the Federal Republic of Germany having its principal place of business at Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany.

It had been entered into the Commercial Register of the District Court of Bingen under HR B 1063 as of 14th day of May 1968. This registration was transferred by law to the Commercial Register of the District Court of Mainz, where it has been registered under HR B 21063 since 28th day of December 2005.

Furthermore, I certify that Dr. Michael Kompter and Dr. Christian Hauke were authorized to sign the foregoing document and still are duly authorized to sign on behalf as procurists of **Boehringer Ingelheim International GmbH**.

Ingelheim am Rhein, the 15th day of July 2010/Ge

Notary public

TESTIMONIO

AL DORSO: ==========

910 E 1

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des
Notars Horst Heintskill in Ingelheim am Rhein
und die Echtheit des beigedrückten Dienstsiegels
werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, dass der
Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Präsidentin des Landgerichts 2 Mainz

Kostenrechnung:
Gebühr für die Erteilung
der Legalisation
Wert: 50.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr: 33,00 €
Mainz, 16.07.10
Heppes-Schwarz
Amtsinspektorin

Präsidentin des Landgerichts 2 Mainz

Mainz, den 16. Juli 2010
Die Präsidentin des Landgerichts
In Vertretung
Dr. Matthias Friedrich
Vorsitzender Richter am Landgericht

CONSULADO GENERAL DEL PERU
FRANCFORT DEL MENO

Se legaliza la firma de:
DR. MATTHIAS FRIEDRICH

Quien desempeña el cargo de:
REPRESENTANTE DEL PRESIDENTE
DEL JUZGADO REGIONAL
EN MAINZ

Nº de Orden: 0363
Nº de Arancel: 1491
Nº de Tarifa: 22 c
Derechos percibidos: S/C. 80.00
€ 22.--

Francfort del Meno, 20 DE julio DE 2010

ALFREDO ARECCO SANTICH
Cónsul General del Perú

"AÑO DEL BICENTENARIO DEL PERU: 200 AÑOS DE INDEPENDENCIA"
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION GENERAL DE POLITICA CONSULAR
Legalización Nº 02720
Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)
Alfredo Arecco Santich
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO
María del Rosario Linyo Jaylet
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Asuntos Consulares
LIMA, 23 JUL 2010

TESTIMONIO

INSERTO. ==========

DE CONFORMIDAD CON LA LEY DEL NOTARIADO, ARTICULO 59, INCISO D), TRANSCRIBO: ==========

CÓDIGO PROCESAL CIVIL: "ARTÍCULO 74º.- FACULTADES GENERALES.- LA REPRESENTACIÓN JUDICIAL CONFIERE AL REPRESENTANTE LAS ATRIBUCIONES Y POTESTADES GENERALES QUE CORRESPONDEN AL REPRESENTADO, SALVO AQUELLAS PARA LAS QUE LA LEY EXIGE FACULTADES EXPRESAS. LA REPRESENTACIÓN SE ENTIENDE OTORGADA PARA TODO EL PROCESO, INCLUSO PARA LA EJECUCIÓN DE LA SENTENCIA Y EL COBRO DE COSTAS Y COSTOS, LEGITIMANDO AL REPRESENTANTE PARA SU INTERVENCIÓN EN EL PROCESO Y REALIZACIÓN DE TODOS LOS ACTOS DEL MISMO, SALVO AQUELLOS QUE REQUIERAN LA INTERVENCIÓN PERSONAL Y DIRECTA DEL REPRESENTADO." ==========

CÓDIGO PROCESAL CIVIL: "ARTÍCULO 75º.- FACULTADES ESPECIALES.- SE REQUIERE EL OTORGAMIENTO DE FACULTADES ESPECIALES PARA REALIZAR TODOS LOS ACTOS DE DISPOSICIÓN DE DERECHOS SUSTANTIVOS Y PARA DEMANDAR, RECONVENIR, CONTESTAR DEMANDAS Y RECONVENCIONES, DESISTIRSE DEL PROCESO Y DE LA PRETENSIÓN, ALLANARSE A LA PRETENSIÓN, CONCILIAR, TRANSIGIR, SOMETER A ARBITRAJE LAS PRETENSIONES CONTROVERTIDAS EN EL PROCESO, SUSTITUIR O DELEGAR LA REPRESENTACIÓN PROCESAL Y PARA LOS DEMÁS ACTOS QUE EXPRESE LA LEY. EL OTORGAMIENTO DE FACULTADES ESPECIALES SE RIGE POR EL PRINCIPIO DE LITERALIDAD. NO SE PRESUME LA EXISTENCIA DE FACULTADES ESPECIALES NO CONFERIDAS EXPLÍCITAMENTE." ==========

CONCLUSION: ==========

FORMALIZADO EL INSTRUMENTO LA COMPARECIENTE LE DIO LECTURA, DESPUES DE LO CUAL SE AFIRMA Y RATIFICA EN SU CONTENIDO, DECLARANDO QUE SE TRATA DE UN ACTO VALIDO Y NO SIMULADO, MANIFESTANDO IGUALMENTE CONOCER LOS ANTECEDENTES Y/O TITULOS QUE SE ORIGINAN POR EL PRESENTE INSTRUMENTO Y DECLARANDO RECONOCER COMO SUYA LA FIRMA DE LA MINUTA QUE LA ORIGINA. ==========

DEJO CONSTANCIA DE HABER ADVERTIDO A LA INTERESADA DE LOS EFECTOS LEGALES DEL PRESENTE INSTRUMENTO NOTARIAL. ==========

LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA SE INICIA EN LA FOJA DE PAPEL NOTARIAL CON NUMERO DE SERIE B Nº0706090 Y CONCLUYE EN LA FOJA DE PAPEL NOTARIAL CON NUMERO DE SERIE B Nº0706093(VUELTA), DE LO QUE DOY FE. ==========

FIRMADO: JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS.- UNA HUELLA DIGITAL.- UNA FIRMA ILEGIBLE.- FIRMÓ EL VEINTISEIS DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ.- ==========

EL PROCESO DE FIRMAS CONCLUYO EL: VEINTISEIS DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ.- ==========

FIRMADO: DR. MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA. ABOGADO - NOTARIO DE LIMA. ==========

ES TRANSCRIPCION DE LA ESCRITURA PUBLICA QUE CORRE EN EL REGISTRO CON FECHA VEINTISEIS DIAS DEL MES DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ DE FOJAS 004590 A FOJAS 004593(VUELTA), Y A SOLICITUD DE PARTE INTERESADA EXPIDO EL PRESENTE, DE ACUERDO A LEY EL QUE RUBRICO EN CADA UNA DE SUS HOJAS, SELLO, SIGNO Y FIRMO EN LIMA, VEINTISEIS DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ. ==========

MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA
ABOGADO
NOTARIO DE LIMA

O DE NOTARIOS DE LIMA CERTIFICA:
ma y sellos que anteceden en esta foja
ca al (la) Notario(a) de Lima,
Benvenuto Murguia
N° 16766 Fecha: 26 JUL 2010
irma del Notario(a) más no el contenido

Juan Gutiérrez Adriazola
FISCAL

Esta carilla está en blanco. Cualquier texto que se consigne carece de valor

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización N° 0297417
Se legaliza la firma que antecede de la señorita
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

Julia Adela Moreno de Duclos
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares

LIMA 27 ABR. 2016

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
Lima – Perú

No. 1793

Lima, 02 Agosto 2010

El suscrito Cónsul General Consulares hace constar que el(a) señor (a) JULIA ADELA MOREANO DE DUEÑAS - DIRECION DE TRAMITES CONSULARES. Cuya firma aparece al pie del presente documento desempeñaba las funciones allí indicadas.

El suscrito Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido de este documento.

Pago Impuesto de Timbre US$10.00
Y derechos consulares US$15.00

JAIRO MONTES MORENO
Cónsul General

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA - LIMA -

Dirección: Jorge Basadre 1580 TEL. (511) 4410530- 4410954 Fax: 2213661-4416922-4218029
Sitio Web: http://www.embajadacolombia.org.pe/html/ - consuladogeneral@embajadacolombia.org.pe

Perú no es miembro del convenio de Apostilla.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2 6 H 8 7 5
JAIRO MONTES
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

2010 AUG 31 A 1:51
NO ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
OFIC. DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.

14

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 April 2011 (07.04.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/039370 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/22* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/064695

(22) International Filing Date:
1 October 2010 (01.10.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09172137.3 2 October 2009 (02.10.2009) EP
10175316.8 3 September 2010 (03.09.2010) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **BORGES, Eric** [DE/DE]; BOEHRINGER INGELHEIM GMBH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **GSCHWIND, Andreas** [DE/DE]; BOEHRINGER INGELHEIM GMBH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **BOUCNEAU, Joachim** [BE/BE]; Gulden-Vlieslaan 64, bus 4, B-8000 Brugge (BE). **DE TAVERNIER, Evelyn** [BE/BE]; Molenberglaan 38, B-9080 Beervelde (BE). **KOLKMAN, Joost** [NL/BE]; Voetweg 13, B-9830 Sint-Martens-Latem (BE). **MERCHIERS, Pascal** [BE/BE]; Loopstraat 23, B-2460 Kasterlee (BE). **VAN HOORICK, Diane** [BE/BE]; Warande 118, B-9270 Laarne (BE).

(74) Agents: **HAMMANN, Heinz,** et al.; BOEHRINGER INGELHEIM GMBH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,

[Continued on next page]

(54) Title: BISPECIFIC BINDING MOLECULES FOR ANTI-ANGIOGENESIS THERAPY

(57) Abstract: Bispecific binding molecules, in particular immunoglobulin single variable domains such as VHHs and domain antibodies, comprising a VEGF-binding component and a Dll4-binding component in one molecule. Pharmaceutical compositions containing same and their use in the treatment of diseases that are associated with VEGF- and Dll4-mediated effects on angiogenesis. Nucleic acids encoding the bispecific binding molecules, host cells and methods for preparing same.

Fig. 48

VHH ID	Format	description
A1		VEGFBII038-*35gs,cys15*-DLLBII018
A2		VEGFBII038-*9gs*-ALB8-*9gs*-DLLBII018
A3		VEGFBII038-*35gs,cys15*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018
HSA1		VEGFBII038-*35gs*-DLLBII018-HSA
HSA2		VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018-HSA
HSA3		DLLBII039-*35gs*-VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-HSA
HSA4		VEGFBII038-*35gs*-DLLBII018-*35gs*-HSA
HSA5		VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018-*35gs*-HSA
HSA6		DLLBII039-*35gs*-VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-HSA

Legend:

Nanobody, linker or HSA	description
	DLLBII018
	DLLBII039
	VEGFBII038
	VEGFBII032
	HSA
	ALB8
	9gs linker
	35gs linker
	PEGylated 35gs,cys15 linker

WO 2011/039370 A1

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

BISPECIFIC BINDING MOLECULES FOR ANTI-ANGIOGENESIS THERAPY

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to the field of human therapy, in particular cancer therapy and agents and compositions useful in such therapy.

BACKGROUND OF THE INVENTION

As summarized in US 2008/0014196, angiogenesis is implicated in the pathogenesis of a number of disorders, including solid tumors and metastasis.

In the case of tumor growth, angiogenesis appears to be crucial for the transition from hyperplasia to neoplasia, and for providing nourishment for the growth and metastasis of the tumor (Folkman *et al.*, Nature 339 -58 (1989)), which allows the tumor cells to acquire a growth advantage compared to the normal cells. Therefore, anti-angiogenesis therapies have become an important treatment option for several types of tumors.

One of the most important pro-angiogenic factors is vascular endothelial growth factor (VEGF-A, in the following referred to as "VEGF"), which belongs to a gene family that includes placenta growth factor (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and VEGF-E and which exists in several isoforms that arise from alternative splicing of mRNA of a single gene, VEGF165 being the biologically most relevant isoform. Therefore, most anti-cancer therapies that rely on anti-angiogenesis have focused on blocking the VEGF pathway (Ferrara *et al.*, Nat Rev Drug Discov. 2004 May; 3(5):391-400).

Recently, Dll4 (or Delta like 4 or delta-like ligand 4) has been identified as a promising target for cancer therapy. Dll4 is a member of the Delta family of Notch ligands. Notch signaling is dysregulated in many cancers, e.g. in T-cell acute lymphoblastic leukemia and in solid tumors (Sharma et al. 2007, Cell Cycle 6 (8): 927–30; Shih et al., Cancer Res. 2007 Mar 1; 67(5): 1879-82).

The extracellular domain of Dll4 is composed of an N-terminal domain, a Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) domain, and a tandem of eight epidermal growth factor (EGF)-like repeats. Generally, the EGF domains are recognized as comprising amino acid residues 218-251 (EGF-1; domain 1), 252-282 (EGF-2; domain 2), 284-322 (EGF-3; domain 3), 324-360 (EGF-4; domain 4), and 362-400 (EGF-5; domain 5), with the DSL domain at about amino acid residues 173-217 and the N-terminal domain at about amino acid residues 27-172 of hDll4 (WO 2008/076379).

It has been reported that Dll4 exhibits highly selective expression by vascular endothelium, in particular in arterial endothelium (Shutter *et al.* (2000) Genes Develop. 14: 1313-1318). Recent studies in mice have shown that Dll4 is induced by VEGF and is a negative feedback regulator that restrains vascular sprouting and branching. Consistent with this role, the deletion or inhibition of Dll4 results in excessive angiogenesis (Scehnet *et al.*, Blood. 2007 Jun 1;109 (11):4753-60). This unrestrained angiogenesis paradoxically decreases tumor growth due to the formation of non-productive vasculature, even in tumors resistant to anti-VEGF therapies (Thurston *et al.*, Nat Rev Cancer. 2007 May; 7(5):327-31; WO 2007/070671; Noguera-Troise *et al.*, Nature. 2006 Dec 21; 444(7122)). In addition to the effects on tumor angiogenesis, inhibition of Dll4 has been shown to reduce the frequency of cancer stem cells in preclinical tumor models (Hoey *et al.*, Cell Stem Cell. 2009 Aug 7; 5(2):168-77).

Several biological compounds that target Dll4 are in (pre-)clinical development have been described: REGN-421 (= SAR153192; Regeneron, Sanofi-Aventis;

WO2008076379) and OPM-21M18 (OncoMed) (Hoey *et al.*, Cell Stem Cell. 2009 Aug 7; 5(2):168-77), both fully human Dll4 antibodies; YW152F (Genentech), a humanized Dll4 antibody (Ridgway *et al.*, Nature. 2006 Dec 21;444(7122):1083-7); Dll4-Fc (Regeneron, Sanofi-Aventis), a recombinant fusion protein composed of the extracellular region of Dll4 and the Fc region of human IgG1 (Noguera-Troise *et al.*, Nature. 2006 Dec 21;444(7122)).

It has been shown that the combined inhibition of VEGF and Dll4 provides superior anti-tumor activity compared to anti-VEGF alone in xenograft models of multiple tumor types and in anti-VEGF resitant tumor models (Noguera-Troise *et al.*, Nature. 2006 Dec 21; 444(7122):1032-7; Ridgway *et al.*, Nature. 2006 Dec 21; 444(7122):1083-7; US 2008175847).

Monoclonal antibodies (MAbs) and fusion proteins have several shortcomings in view of their therapeutic application: To prevent their degradation, they must be stored at near freezing temperatures. Also, since they are quickly digested in the gut, they are not suited for oral administration. Another major restriction of MAbs for cancer therapy is poor transport, which results in low concentrations and a lack of targeting of all cells in a tumor.

Also, the state-of-the art therapies that are based on targeting both VEGF and Dll4, represent a combination therapy involving two individual inhibitors, i.e. an VEGF-binding molecule and a separate Dll4-binding molecule. However, these therapies have the drawbacks that development and production of two separate drugs involves high costs and many resources, two drugs may have different pharmacokinetic properties and that administration of two drugs is inconvenient for the patient.

In view of the above, it has been an object of the invention to provide improved molecules for human anti-tumor therapy.

The present invention is based on the concept of combining one or more VEGF-binding molecules with one or more Dll4-binding molecules in a single therapeutic agent.

Thus, the invention relates to bispecific binding molecules comprising one or more Dll4-binding molecules and one or more VEGF-binding molecules.

In the following, if not otherwise stated, the term "binding molecule" (or "antigen-binding molecule") refers to either or both of a Dll4-binding molecule, in particular an immunoglobulin single variable domain, or a VEGF-binding molecule, in particular an immunoglobulin single variable domain. The term "bispecific binding molecule" refers to a molecule comprising at least one Dll4-binding molecule (or "binding component") and at least one VEGF-binding molecule (or binding component). A bispecific binding molecule may contain more than one Dll4-binding molecule and/or more than one VEGF-binding molecule, i.e. in the case that the bispecific binding molecule contains a biparatopic (as defined below) Dll4-binding molecule and/or a biparatopic VEGF-binding molecule, in the part of the molecule that binds to Dll4 or to VEGF, i.e. in its "Dll4-binding component" (or anti-Dll4 component) or "VEGF-binding component" (or anti-VEGF component), respectively.

The bispecific binding molecules of the invention are useful as pharmacologically active agents in compositions in the prevention, treatment, alleviation and/or diagnosis of diseases or conditions that can be modulated by inhibition of Dll4, such as cancer.

It has been a further object of the invention to provide methods for the prevention, treatment, alleviation and/or diagnosis of such diseases, disorders or conditions, involving the use and/or administration of such agents and compositions.

In particular, it is has been an object of the invention to provide such pharmacologically active agents, compositions and/or methods that provide certain advantages compared to the agents, compositions and/or methods currently used and/or known in the art.

These advantages include improved therapeutic and/or pharmacological properties and/or other advantageous properties, e.g. for manufacturing purposes, especially as compared to conventional antibodies as those described above, or fragments thereof.

More in particular, it has been an object of the invention to provide novel molecules, and, specifically, molecules that bind to mammalian and, especially, human Dll4 and human VEGF, wherein such molecules are suitable for the therapeutic and diagnostic purposes as described herein.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

According to a first aspect, there are provided bispecific binding molecules, comprising a Dll4-binding component and a VEGF-binding component in a single molecule.

More specifically, a bispecific binding molecule of the invention essentially comprises (i) a Dll4-binding component specifically binding to at least one epitope of Dll4 and (ii) a VEGF-binding component specifically binding to at least an epitope of VEGF, wherein the components are linked to each other in such a way that they simultaneously bind to Dll4 and VEGF or that they bind to either Dll4 or VEGF at a time.

According to preferred aspects of the invention, the two components comprise one or more immunoglobulin single variable domains that may be, independently of each other, VHHs or domain antibodies, and/or any other sort of immunoglobulin single variable domains, such as VL domains, as defined

herein, provided that each of these immunoglobulin single variable domains will bind the antigen, i.e. Dll4 or VEGF, respectively.

According to a preferred embodiment, the immunoglobulin single variable domains are of the same type, in particular, all immunoglobulin single variable domains are VHHs or domain antibodies.

According to a particularly preferred embodiment, all immunoglobulin single variable domains are VHHs, preferably humanized (or "sequence-optimized", as defined herein) VHHs. Accordingly, the invention relates to bispecific binding molecules comprising an (optionally humanized or sequence-optimized) anti-Dll4 VHH and an (optionally humanized or sequence-optimized) anti-VEGF VHH.

However, it will be clear to the skilled person that the teaching herein may be applied analogously to bispecific binding molecules including other anti-Dll4 or anti-VEGF immunoglobulin single variable domains, such as domain antibodies.

In another aspect, the invention relates to nucleic acids encoding the bispecific binding molecules of the invention as well as host cells containing same.

The invention further relates to a product or composition containing or comprising at least one bispecific binding molecule of the invention and optionally one or more further components of such compositions.

The invention further relates to methods for preparing or generating the bispecific binding molecules, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein.

The invention further relates to applications and uses of the bispecific binding molecules, nucleic acids, host cells, products and compositions described

herein, as well as to methods for the prevention and/or treatment for diseases and disorders that can be modulated by inhibition of Dll4.

These and other aspects, embodiments, advantages and applications of the invention will become clear from the further description hereinbelow.

DEFINITIONS

Unless indicated or defined otherwise, all terms used have their usual meaning in the art, which will be clear to the skilled person. Reference is for example made to the standard handbooks, such as Sambrook *et al*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), and Roitt *et al.*, "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), as well as to the general background art cited herein; Furthermore, unless indicated otherwise, all methods, steps, techniques and manipulations that are not specifically described in detail can be performed and have been performed in a manner known *per se*, as will be clear to the skilled person. Reference is for example again made to the standard handbooks, to the general background art referred to above and to the further references cited therein.

Unless indicated otherwise, the terms "*immunoglobulin*" and "*immunoglobulin sequence*" - whether used herein to refer to a *heavy chain antibody* or to a *conventional 4-chain antibody* - are used as general terms to include both the full-size antibody, the individual chains thereof, as well as all parts, domains or fragments thereof (including but not limited to antigen-binding domains or fragments such as VHH domains or VH/VL domains, respectively). In addition, the term "sequence" as used herein (for example in terms like "immunoglobulin sequence", "antibody sequence", "(single) variable domain sequence", "VHH sequence" or "protein sequence"), should generally be understood to

19

include both the relevant amino acid sequence as well as nucleic acid sequences or nucleotide sequences encoding the same, unless the context requires a more limited interpretation.

The term "*domain*" (of a polypeptide or protein) as used herein refers to a folded protein structure which has the ability to retain its tertiary structure independently of the rest of the protein. Generally, domains are responsible for discrete functional properties of proteins, and in many cases may be added, removed or transferred to other proteins without loss of function of the remainder of the protein and/or of the domain.

The term "*immunoglobulin domain*" as used herein refers to a globular region of an antibody chain (such as e.g. a chain of a conventional 4-chain antibody or of a heavy chain antibody), or to a polypeptide that essentially consists of such a globular region. Immunoglobulin domains are characterized in that they retain the immunoglobulin fold characteristic of antibody molecules, which consists of a 2-layer sandwich of about 7 antiparallel beta-strands arranged in two beta-sheets, optionally stabilized by a conserved disulphide bond.

The term "*immunoglobulin variable domain*" as used herein means an immunoglobulin domain essentially consisting of four "framework regions" which are referred to in the art and hereinbelow as "framework region 1" or "FR1"; as "framework region 2" or"FR2"; as "framework region 3" or "FR3"; and as "framework region 4" or "FR4", respectively; which framework regions are interrupted by three "complementarity determining regions" or "CDRs", which are referred to in the art and hereinbelow as "complementarity determining region 1"or "CDR1"; as "complementarity determining region 2" or "CDR2"; and as "complementarity determining region 3" or "CDR3", respectively. Thus, the general structure or sequence of an immunoglobulin variable domain can be indicated as follows: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3

- CDR3 - FR4. It is the immunoglobulin variable domain(s) that confer specificity to an antibody for the antigen by carrying the antigen-binding site.

The term "*immunoglobulin single variable domain*" as used herein means an immunoglobulin variable domain which is capable of specifically binding to an epitope of the antigen without pairing with an additional variable immunoglobulin domain. One example of immunoglobulin single variable domains in the meaning of the present invention are "*domain antibodies*", such as the immunoglobulin single variable domains VH and VL (VH domains and VL domains). Another example of immunoglobulin single variable domains are "*VHH domains*" (or simply "VHHs") from camelids, as defined hereinafter.

In view of the above definition, the antigen-binding domain of a conventional 4-chain antibody (such as an IgG, IgM, IgA, IgD or IgE molecule; known in the art) or of a Fab fragment, a F(ab')2 fragment, an Fv fragment such as a disulphide linked Fv or a scFv fragment, or a diabody (all known in the art) derived from such conventional 4-chain antibody, would normally not be regarded as an immunoglobulin single variable domain, as, in these cases, binding to the respective epitope of an antigen would normally not occur by one (single) immunoglobulin domain but by a pair of (associating) immunoglobulin domains such as light and heavy chain variable domains, i.e. by a VH-VL pair of immunoglobulin domains, which jointly bind to an epitope of the respective antigen.

"*VHH domains*", also known as VHHs, V_HH domains, VHH antibody fragments, and VHH antibodies, have originally been described as the antigen binding immunoglobulin (variable) domain of "heavy chain antibodies" (i.e. of "antibodies devoid of light chains"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)). The term "VHH domain" has been chosen in order to distinguish these

variable domains from the heavy chain variable domains that are present in conventional 4-chain antibodies (which are referred to herein as "V_H domains" or "VH domains") and from the light chain variable domains that are present in conventional 4-chain antibodies (which are referred to herein as "V_L domains" or "VL domains"). VHH domains can specifically bind to an epitope without an additional antigen binding domain (as opposed to VH or VL domains in a conventional 4-chain antibody, in which case the epitope is recognized by a VL domain together with a VH domain). VHH domains are small, robust and efficient antigen recognition units formed by a single immunoglobulin domain.

In the context of the present invention, the terms VHH domain, VHH, V_HH domain, VHH antibody fragment, VHH antibody, as well as "Nanobody®" and "Nanobody® domain" ("Nanobody" being a trademark of the company Ablynx N.V.; Ghent; Belgium) are used interchangeably and are representatives of immunoglobulin single variable domains (having the structure FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 and specifically binding to an epitope without requiring the presence of a second immunoglobulin variable domain), and which are distinguished from VH domains by the so-called "hallmark residues", as defined in e.g. WO2009/109635, Fig. 1.

The amino acid residues of a immunoglobulin single variable domain, e.g. a VHH, are numbered according to the general numbering for V_H domains given by Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91), as applied to VHH domains from camelids, as shown e.g. in Figure 2 of Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). According to this numbering,

- FR1 comprises the amino acid residues at positions 1-30,
- CDR1 comprises the amino acid residues at positions 31-35,
- FR2 comprises the amino acids at positions 36-49,

- CDR2 comprises the amino acid residues at positions 50-65,
- FR3 comprises the amino acid residues at positions 66-94,
- CDR3 comprises the amino acid residues at positions 95-102, and
- FR4 comprises the amino acid residues at positions 103-113.

However, it should be noted that - as is well known in the art for V_H domains and for VHH domains - the total number of amino acid residues in each of the CDRs may vary and may not correspond to the total number of amino acid residues indicated by the Kabat numbering (that is, one or more positions according to the Kabat numbering may not be occupied in the actual sequence, or the actual sequence may contain more amino acid residues than the number allowed for by the Kabat numbering). This means that, generally, the numbering according to Kabat may or may not correspond to the actual numbering of the amino acid residues in the actual sequence.

Alternative methods for numbering the amino acid residues of V_H domains, which methods can also be applied in an analogous manner to VHH domains, are known in the art. However, in the present description, claims and figures, the numbering according to Kabat and applied to VHH domains as described above will be followed, unless indicated otherwise.

The total number of amino acid residues in a VHH domain will usually be in the range of from 110 to 120, often between 112 and 115. It should however be noted that smaller and longer sequences may also be suitable for the purposes described herein.

Immunoglobulin single variable domains (e.g. VHHs and domain antibodies), have a number of unique structural characteristics and functional properties which makes them highly advantageous for use in therapy as functional antigen-binding molecules. In particular, and without being limited thereto, VHH domains (which have been "designed" by nature to functionally bind to an

21

antigen without pairing with a light chain variable domain) can function as single, relatively small, functional antigen-binding structural units.

Due to their unique properties, immunoglobulin single variable domains, as defined herein, like VHHs or VHs (or VLs) - either alone or as part of a larger polypeptide, e.g. a biparatopic molecule or a bispecific binding molecule, offer a number of significant advantages:

- only a single domain is required to bind an antigen with high affinity and with high selectivity, so that there is no need to have two separate domains present, nor to assure that these two domains are present in the right spacial conformation and configuration (i.e. through the use of especially designed linkers, as with scFv's);
- immunoglobulin single variable domains can be expressed from a single nucleic acid molecule and do not require any post-translational modification (like glycosylation;
- immunoglobulin single variable domains can easily be engineered into multivalent and multispecific formats (as further discussed herein);
- immunoglobulin single variable domains have high specificity and affinity for their target, low inherent toxicity and can be administered via alternative routes than infusion or injection;
- immunoglobulin single variable domains are highly stable to heat, pH, proteases and other denaturing agents or conditions and, thus, may be prepared, stored or transported without the use of refrigeration equipments;
- immunoglobulin single variable domains are easy and relatively inexpensive to prepare, both on small scale and on a manufacturing scale. For example, immunoglobulin single variable domains and

polypeptides containing the same can be produced using microbial fermentation (e.g. as further described below) and do not require the use of mammalian expression systems, as with for example conventional antibodies;

- immunoglobulin single variable domains are relatively small (approximately 15 kDa, or 10 times smaller than a conventional IgG) compared to conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof, and therefore show high(er) penetration into tissues (including but not limited to solid tumors and other dense tissues) and can be administered in higher doses than such conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof;

- VHHs have specific so-called "cavity-binding properties" (inter alia due to their extended CDR3 loop, compared to VH domains from 4-chain antibodies) and can therefore also access targets and epitopes not accessible to conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof;

- VHHs have the particular advantage that they are highly soluble and very stable and do not have a tendency to aggregate (as with the mouse-derived antigen-binding domains described by Ward *et al.*, Nature 341: 544-546 (1989)).

The immunoglobulin single variable domains contained in the components of the bispecific binding molecules of the invention, are not limited with respect to a specific biological source from which they have been obtained or to a specific method of preparation. For example, obtaining VHHs may include the following steps:

(1) isolating the VHH domain of a naturally occurring heavy chain antibody; or screening a library comprising heavy chain antibodies or VHHs and isolating

VHHs therefrom;

(2) expressing a nucleic acid molecule encoding a VHH with the naturally occurring sequence;

(3) "humanizing" (or sequence-optimizing) a VHH, optionally after affinity maturation, with a naturally occurring sequence or expressing a nucleic acid encoding such humanized VHH;

(4) "camelizing" (as described below) a immunoglobulin single variable heavy domain from a naturally occurring antibody from an animal species, in particular a species of mammal, such as from a human being, or expressing a nucleic acid molecule encoding such camelized domain;

(5) "camelizing" a VH, or expressing a nucleic acid molecule encoding such a camelized VH;

(6) using techniques for preparing synthetically or semi-synthetically proteins, polypeptides or other amino acid sequences;

(7) preparing a nucleic acid molecule encoding a VHH domain using techniques for nucleic acid synthesis, followed by expression of the nucleic acid thus obtained;

(8) subjecting heavy chain antibodies or VHHs to affinity maturation, to mutagenesis (e.g. random mutagenesis or site-directed mutagenesis) and/or any other technique(s) in order to increase the affinity and/or specificity of the VHH; and/or

(9) combinations or selections of the foregoing steps.

Suitable methods and techniques for performing the above-described steps are known in the art and will be clear to the skilled person.

According to a specific embodiment, the immunoglobulin single variable domains present in the bispecific binding molecules of the invention are VHHs with an amino acid sequence that essentially corresponds to the amino acid sequence of a naturally occurring VHH domain, but that has been humanized

(sequence-optimized), optionally after affinity-maturation), i.e. by replacing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of said naturally occurring VHH sequence by one or more of the amino acid residues that occur at the corresponding position(s) in a variable heavy domain of a conventional 4-chain antibody from a human being. This can be performed using methods known in the art, which can by routinely used by the skilled person.

A sequence-optimized VHH may contain one or more fully human framework region sequences, and, in an even more specific embodiment, may contain human framework region sequences derived from the human germline Vh3 sequences DP-29, DP-47, DP-51, or parts thereof, or be highly homologous thereto. Thus, a humanization protocol may comprise the replacement of any of the VHH residues with the corresponding framework 1, 2 and 3 (FRI, FR2 and FR3) residues of germline VH genes such as DP 47, DP 29 and DP 51) either alone or in combination. Suitable framework regions (FR) of the immunoglobulin single variable domains of the invention can be selected from those as set out e.g. in WO 2006/004678 and specifically, include the so-called "KERE" and "GLEW" classes. Particularly preferred are immunoglobulin single variable domains having the amino acid sequence G-L-E-W at about positions 44 to 47, and their respective humanized counterparts.

By way of example, a humanizing substitution for VHHs belonging to the 103 P,R,S-group and/or the GLEW-group (as defined below) is 108Q to 108L. Methods for humanizing immunoglobulin single variable domains are known in the art.

Binding immunoglobulin single variable domains with improved properties in view of therapeutic application, e.g. enhanced affinity or decreased immunogenicity, may be obtained from individual binding molecules by techniques known in the art, such as affinity maturation (for example, starting from synthetic, random or naturally occurring immunoglobulin sequences),

CDR grafting, humanizing, combining fragments derived from different immunoglobulin sequences, PCR assembly using overlapping primers, and similar techniques for engineering immunoglobulin sequences well known to the skilled person; or any suitable combination of any of the foregoing, also termed "sequence optimization", as described herein. Reference is, for example, made to standard handbooks, as well as to the further description and Examples.

If appropriate, a binding molecule with increased affinity may be obtained by affinity-maturation of another binding molecule, the latter representing, with respect to the affinity-matured molecule, the "parent" binding molecule.

Methods of obtaining VHHs that bind to a specific antigen or epitope have been described earlier, e.g. in WO2006/040153 and WO2006/122786. As also described therein in detail, VHH domains derived from camelids can be "humanized" (also termed "sequence-optimized" herein, "sequence-optimizing" may, in addition to humanization, encompass an additional modification of the sequence by one or more mutations that furnish the VHH with improved properties, such as the removal of potential post translational modification sites) by replacing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of the original VHH sequence by one or more of the amino acid residues that occur at the corresponding position(s) in a VH domain from a conventional 4-chain antibody from a human being. A humanized VHH domain may contain one or more fully human framework region sequences, and, in an even more specific embodiment, may contain human framework region sequences derived from DP-29, DP-47, DP-51, or parts thereof, optionally combined with JH sequences, such as JH5.

Domain antibodies, also known as "Dab"s and "dAbs" (the terms "Domain Antibodies" and "dAbs" being used as trademarks by the GlaxoSmithKline group of companies) have been described in e.g. Ward, E.S., *et al.*: "Binding

activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli"; Nature 341: 544-546 (1989); Holt, L.J. *et al.*: "Domain antibodies: proteins for therapy"; TRENDS in Biotechnology 21(11): 484-490 (2003); and WO2003/002609.

Domain antibodies essentially correspond to the VH or VL domains of antibodies from non-camelid mammals, in particular human 4-chain antibodies. In order to bind an epitope as a single antigen binding domain, i.e. without being paired with a VL or VH domain, respectively, specific selection for such antigen binding properties is required, e.g. by using libraries of human single VH or VL domain sequences.

Domain antibodies have, like VHHs, a molecular weight of approximately 13 to approximately 16 kDa and, if derived from fully human sequences, do not require humanization for e.g. therapeutical use in humans. As in the case of VHH domains, they are well expressed also in prokaryotic expression systems, providing a significant reduction in overall manufacturing cost.

Furthermore, it will also be clear to the skilled person that it is possible to "graft" one or more of the CDR's mentioned above onto other "scaffolds", including but not limited to human scaffolds or non-immunoglobulin scaffolds. Suitable scaffolds and techniques for such CDR grafting are known in the art.

The terms "*epitope*" and "*antigenic determinant*", which can be used interchangeably, refer to the part of a macromolecule, such as a polypeptide, that is recognized by antigen-binding molecules, such as conventional antibodies or the polypeptides of the invention, and more particularly by the antigen-binding site of said molecules. Epitopes define the minimum binding site for an immunoglobulin, and thus represent the target of specificity of an immunoglobulin.

29

A polypeptide (such as an immunoglobulin, an antibody, an immunoglobulin single variable domain of the invention, or generally a binding molecule or a fragment thereof) that can "*bind to*" or "*specifically bind to*", that "*has affinity for*" and/or that "*has specificity for*" a certain epitope, antigen or protein (or for at least one part, fragment or epitope thereof) is said to be "*against*" or "*directed against*" said epitope, antigen or protein or is a "*binding*" molecule with respect to such epitope, antigen or protein. In this context, a VEGF- or Dll4-binding molecule may also be referred to as "VEGF-neutralizing" or "Dll4-neutralizing", respectively.

Generally, the term "*specificity*" refers to the number of different types of antigens or epitopes to which a particular antigen-binding molecule or antigen-binding protein (such as an immunoglobulin single variable domain) molecule can bind. The specificity of an antigen-binding molecule can be determined based on its affinity and/or avidity. The affinity, represented by the equilibrium constant for the dissociation of an antigen with an antigen-binding protein (KD), is a measure for the binding strength between an epitope and an antigen-binding site on the antigen-binding protein: the lesser the value of the KD, the stronger the binding strength between an epitope and the antigen-binding molecule (alternatively, the affinity can also be expressed as the affinity constant (KA), which is 1/KD). As will be clear to the skilled person (for example on the basis of the further disclosure herein), affinity can be determined in a manner known per se, depending on the specific antigen of interest. Avidity is the measure of the strength of binding between an antigen-binding molecule (such as an immunoglobulin, an antibody, an immunoglobulin single variable domain or a polypeptide containing it and the pertinent antigen. Avidity is related to both the affinity between an epitope and its antigen binding site on the antigen-binding molecule and the number of pertinent binding sites present on the antigen-binding molecule.

The part of an antigen-binding molecule that recognizes the epitope is called a *paratope*.

Unless indicated otherwise, the term "Dll4-binding molecule" or "VEGF-binding molecule" includes anti-Dll4 or anti-VEGF antibodies, anti-Dll4 antibody or anti-VEGF antibody fragments, "anti-Dll4 antibody-like molecules" or "anti-VEGF antibody-like molecules", as defined herein, and conjugates with any of these. Antibodies include, but are not limited to, monoclonal and chimerized monoclonal antibodies. The term „antibody" encompasses complete immunoglobulins, like monoclonal antibodies produced by recombinant expression in host cells, as well as antibody fragments or "antibody-like molecules", including single-chain antibodies and linear antibodies, so-called "SMIPs" ("Small Modular Immunopharmaceuticals"), as e.g described in WO 02/056910; Antibody-like molecules include immunoglobulin single variable domains, as defined herein. Other examples for antibody-like molecules are immunoglobulin super family antibodies (IgSF), or CDR-grafted molecules.

"*VEGF-binding molecule" or "Dll4-binding molecule" respectively,* refers to both monovalent target-binding molecules (i.e. molecules that bind to one epitope of the respective target) as well as to bi- or multivalent binding molecules (i.e. binding molecules that bind to more than one epitope, e.g. "biparatopic" molecules as defined hereinbelow). VEGF(or Dll4)-binding molecules containing more than one VEGF(or Dll4)-binding immunoglobulin single variable domain are also termed "formatted" binding molecules, they may, within the target-binding component, in addition to the immunoglobulin single variable domains, comprise linkers and/or moieties with effector functions, e.g. half-life-extending moieties like albumin-binding immunoglobulin single variable domains, and/or a fusion partner like serum albumin and/or an attached polymer like PEG.

The term "*biparatopic VEGF(or Dll4)-binding molecule*" or "*biparatopic immunoglobulin single variable domain*" as used herein shall mean a binding molecule comprising a first immunoglobulin single variable domain and a second immunoglobulin single variable domain as herein defined, wherein the two molecules bind to two non-overlapping epitopes of the respective antigen. The biparatopic binding molecules are composed of immunoglobulin single variable domains which have different specificities with respect to the epitope. The part of an antigen-binding molecule (such as an antibody or an immunoglobulin single variable domain of the invention) that recognizes the epitope is called a *paratope*.

A formatted binding molecule may, albeit less preferred, also comprise two identical immunoglobulin single variable domains or two different immunoglobulin single variable domains that recognize the same or overlapping epitopes or their respective antigen. In this case, with respect to VEGF, the two immunoglobulin single variable domains may bind to the same or an overlapping epitope in each of the two monomers that form the VEGF dimer.

Typically, the binding molecules of the invention will bind with a dissociation constant (K_D) of 10E-5 to 10E-14 moles/liter (M) or less, and preferably 10E-7 to 10E-14 moles/liter (M) or less, more preferably 10E-8 to 10E-14 moles/liter, and even more preferably 10E-11 to 10E-13, as measured e.g. in a Biacore or in a Kinexa assay), and/or with an association constant (K_A) of at least 10E7 ME-1, preferably at least 10E8 ME-1, more preferably at least 10E9 ME-1, such as at least 10E11 ME-1. Any K_D value greater than 10E-4 M is generally considered to indicate non-specific binding. Preferably, a polypeptide of the invention will bind to the desired antigen, i.e. VEGF or Dll4, respectively, with a K_D less than 500 nM, preferably less than 200 nM, more preferably less than 10 nM, such as less than 500 pM. Specific binding of an antigen-binding

protein to an antigen or epitope can be determined in any suitable manner known per se, including, for example, the assays described herein, Scatchard analysis and/or competitive binding assays, such as radioimmunoassays (RIA), enzyme immunoassays (EIA) and sandwich competition assays, and the different variants thereof known per se in the art.

Amino acid residues will be indicated according to the standard three-letter or one-letter amino acid code, as generally known and agreed upon in the art. When comparing two amino acid sequences, the term "*amino acid difference*" refers to insertions, deletions or substitutions of the indicated number of amino acid residues at a position of the reference sequence, compared to a second sequence. In case of substitution(s), such substitution(s) will preferably be conservative amino acid substitution(s), which means that an amino acid residue is replaced with another amino acid residue of similar chemical structure and which has little or essentially no influence on the function, activity or other biological properties of the polypeptide. Such conservative amino acid substitutions are well known in the art, for example from WO 98/49185, wherein conservative amino acid substitutions preferably are substitutions in which one amino acid within the following groups (i) - (v) is substituted by another amino acid residue within the same group: (i) small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues: Ala, Ser, Thr, Pro and Gly; (ii) polar, negatively charged residues and their (uncharged) amides: Asp, Asn, Glu and Gln; (iii) polar, positively charged residues: His, Arg and Lys; (iv) large aliphatic, nonpolar residues: Met, Leu, Ile, Val and Cys; and (v) aromatic residues: Phe, Tyr and Trp. Particularly preferred conservative amino acid substitutions are as follows: Ala into Gly or into Ser; Arg into Lys; Asn into Gln or into His; Asp into Glu;Cys into Ser; Gln into Asn; Glu into Asp; Gly into Ala or into Pro; His into Asn or into Gln; Ile into Leu or into Val; Leu into Ile or into Val; Lys into Arg, into Gln or into Glu; Met into Leu, into Tyr or into Ile; Phe into Met, into

Leu or into Tyr; Ser into Thr; Thr into Ser;Trp into Tyr; Tyr into Trp or into Phe; Val into Ile or into Leu.

A polypeptide or nucleic acid molecule is considered to be "*(in) essentially isolated (form)*" - for example, when compared to its native biological source and/or the reaction medium or cultivation medium from which it has been obtained - when it has been separated from at least one other component with which it is usually associated in said source or medium, such as another protein/polypeptide, another nucleic acid, another biological component or macromolecule or at least one contaminant, impurity or minor component. In particular, a polypeptide or nucleic acid molecule is considered "essentially isolated" when it has been purified at least 2-fold, in particular at least 10-fold, more in particular at least 100-fold, and up to 1000-fold or more. A polypeptide or nucleic acid molecule that is "in essentially isolated form" is preferably essentially homogeneous, as determined using a suitable technique, such as a suitable chromatographical technique, such as polyacrylamide gel electrophoresis.

"*Sequence identity*" between two VEGF-binding molecule sequences indicates the percentage of amino acids that are identical between the sequences. It may be calculated or determined as described in paragraph f) on pages 49 and 50 of WO 08/020079. "Sequence similarity" indicates the percentage of amino acids that are either identical or that represent conservative amino acid substitutions.

Alternative methods for numbering the amino acid residues of V_H domains, which methods can also be applied in an analogous manner to VHH domains, are known in the art. However, in the present description, claims and figures, the numbering according to Kabat and applied to VHH domains as described above will be followed, unless indicated otherwise.

An "affinity-matured" binding molecule, in particular a VHH or a domain antibody, has one or more alterations in one or more CDRs which result in an improved affinity forits target, as compared to the respective parent binding molecule. Afffinity-matured binding molecules may be prepared by methods known in the art, for example, as described by Marks *et al.*, 1992, Biotechnology 10:779-783, or Barbas, *et al.*, 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813.; Shier *et al.*, 1995, Gene 169:147-155; Yelton *et al.*, 1995, Immunol. 155: 1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; and Hawkins *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 226(3): 889 896; KS Johnson and RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

For the present invention, an "amino acid sequences of SEQ ID NO: x": includes, if not otherwise stated, an amino acid sequence that is 100% identical with the sequence shown in the respective SEQ ID NO: x;

a) amino acid sequences that have at least 80% amino acid identity with the sequence shown in the respective SEQ ID NO: x;

b) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid differences with the sequence shown in the respective SEQ ID NO: x.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth/proliferation. Examples of cancer to be treated with a bispecific binding molecule of the invention, include but are not limited to carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers, as suggested for treatment with Dll4 antagonists in US 2008/0014196, include squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer,

glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, gastric cancer, melanoma, and various types of head and neck cancer. Dysregulation of angiogenesis can lead to many disorders that can be treated by compositions and methods of the invention. These disorders include both non-neoplastic and neoplastic conditions. Neoplasties include but are not limited those described above. Non-neoplastic disorders include, but are not limited to, as suggested for treatment with Dll4 antagonists in US 2008/0014196, undesired or aberrant hypertrophy, arthritis, rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, psoriatic plaques, sarcoidosis, atherosclerosis, atherosclerotic plaques, diabetic and other proliferative retinopathies including retinopathy of prematurity, retrolental fibroplasia, neovascular glaucoma, age-related macular degeneration, diabetic macular edema, corneal neovascularization, corneal graft neovascularization, corneal graft rejection, retinal/choroidal neovascularization, neovascularization of the angle (rubeosis), ocular neovascular disease, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, thyroid hyperplasias (including Grave's disease), corneal and other tissue transplantation, chronic inflammation, lung inflammation, acute lung injury/ ARDS, sepsis, primary pulmonary hypertension, malignant pulmonary effusions, cerebral edema (e.g., associated with acute stroke/ closed head injury/ trauma), synovial inflammation, pannus formation in RA, myositis ossificans, hypertropic bone formation, osteoarthritis (OA), refractory ascites, polycystic ovarian disease, endometriosis, 3rd spacing of fluid diseases (pancreatitis, compartment syndrome, burns, bowel disease), uterine fibroids, premature labor, chronic inflammation such as IBD (Crohn's disease and ulcerative colitis), renal allograft rejection, inflammatory bowel disease, nephrotic syndrome, undesired

or aberrant tissue mass growth (non-cancer), hemophilic joints, hypertrophic scars, inhibition of hair growth, Osier-Weber syndrome, pyogenic granuloma retrolental fibroplasias, scleroderma, trachoma, vascular adhesions, synovitis, dermatitis, preeclampsia, ascites, pericardial effusion (such as that associated with pericarditis), and pleural effusion.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In a first aspect, the present invention relates to a bispecific binding molecule comprising a Dll4-binding component and a VEGF-binding component.

According to preferred embodiments, said Dll4-binding component and said VEGF-binding component comprise at least one Dll4-binding immunoglobulin single variable domain and at least one VEGF-binding immunoglobulin single variable domain, respectively.

In a preferred aspect, said Dll4-binding component and said VEGF-binding component each comprise at least one VEGF-binding immunoglobulin single variable domain and at least one Dll4-binding immunoglobulin single variable domain, respectively, wherein each of said immunoglobulin single variable domains has four framework regions and three complementarity determining regions CDR1, CDR2 and CDR3, respectively, wherein

a) a CDR3 of said at least one Dll4-binding immunoglobulin single variable domain has an amino acid sequence selected from

   i) Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Xaa Pro Tyr Xaa Tyr Asp Xaa as shown in SEQ ID NO: 1, wherein
   Xaa at position 8 is Arg, Ala or Glu;
   Xaa at position 11 is Leu or Glu; and
   Xaa at position 14 is Tyr or His; and

ii) Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala Tyr Xaa Asp Tyr as shown in SEQ ID NO: 2, wherein
Xaa is Gln, Ala or Tyr; and wherein

b) a CDR3 of said at least one VEGF-binding immunoglobulin single variable domain has the amino acid sequence Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Xaa Tyr, as shown in SEQ ID NO: 3, wherein Xaa is Asp or Glu,

wherein said VEGF-binding immunoglobulin single variable domain is capable of blocking the interaction of human recombinant VEGF165 with the human recombinant VEGFR-2 with an inhibition rate of ≥60%.

According to preferred embodiments, the immunoglobulin single variable domains are VHHs.

In preferred embodiments, a bispecific binding molecule of the invention contains immunoglobulin single variable domains, in particular VHHs, that have been obtained by sequence optimization, optionally after affinity maturation, of a parent immunoglobulin single variable domain.

By way of example, the Dll4-binding molecules contained in the bispecific binding molecules have been obtained from parent Dll4-binding molecules that are VHHs with amino acid sequences shown in Table 5 and SEQ ID NOs: 4 - 20.

Preferred immunoglobulin single variable domains contained in the Dll4-binding component are derived from a VHH with an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10.

In certain embodiments, said preferred Dll4-binding immunoglobulin single variable domains have been obtained by sequence optimization of affinity-matured VHHs derived from the VHH with the sequence shown in SEQ ID

NO: 10, wherein said affinity-matured VHHs have amino acid sequences shown in SEQ ID NOs: 21 – 27 and in Table 16.

In a preferred embodiment, said affinity-matured VHH has an amino acid sequence selected from sequences shown in SEQ ID NO: 22.

In preferred embodiments, the VHH has been obtained by sequence optimization of a VHH with an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 22. Preferred sequence-optimized VHHs have amino acid sequences selected from sequences shown in SEQ ID NOs: 34 and 35 and in Table 23.

Another group of preferred immunoglobulin single variable domains contained in the Dll4-binding component are derived from a VHH with an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12.

In certain embodiments, said preferred Dll4-binding immunoglobulin single variable domains have been obtained by sequence optimization of affinity-matured VHHs derived from the VHH with the sequence shown in SEQ ID NO: 12, wherein said affinity-matured VHHs have amino acid sequences shown in SEQ ID NOs: 28 – 33 and in Table 17.

In a preferred embodiment, said affinity-matured VHH has an amino acid sequence selected from sequences shown in SEQ ID NOs: 30, 32 and 33.

In an even more preferred embodiment, the VHH has been obtained by sequence optimization of a VHH with an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 32. Examples of sequence-optimized VHHs are those with sequences shown in SEQ ID NOs: 36 – 39 and Table 24, and, particularly preferred, those with SEQ ID NOs: 40 and 41, shown in Table 25.

Examples for VEGF-binding immunoglobulin single variable domains capable of blocking the interaction of human recombinant VEGF165 with the human

recombinant VEGFR-2 with an inhibition rate of ≥60% are VHHs shown in SEQ ID NOs: 42 – 44 and Table 32.

Preferably, a VEGF-binding immunoglobulin single variable domain contained in the VEGF-binding component has been obtained by sequence optimization of a VHH with an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 43. Preferred VHHs have sequences as shown in SEQ ID NOs: 54 – 62, particularly preferred receptor-blocking VHHs have sequences shown in SEQ ID NOs: 63 and 64 and Table 59.

In a further embodiment, the invention relates to bispecific binding molecules, wherein the Dll4-binding component and/or the VEGF-binding component comprise(s) two or more binding molecules in the form of immunoglobulin single variable domains that bind to the antigen Dll4, or VEGF, respectively, at different non-overlapping epitopes on the respective antigen. Such binding molecules contained in the bispecific binding molecules of the invention comprise immunoglobulin single variable domains that are directed against at least two non-overlapping epitopes present in Dll4 or VEGF, respectively, wherein said individual immunoglobulin single variable domains are linked to each other in such a way that they are capable of simultaneously binding to their respective epitope.

Thus, the anti-Dll4 and/or the anti-VEGF component contained in the bispecific binding molecules of the invention may include two (or more) anti-Dll4 (or anti-VEGF, respectively) immunoglobulin single variable domains, wherein the immunoglobulin single variable domains are directed against different epitopes within the Dll4 (or VEGF) target. Thus, the two immunoglobulin single variable domains in a bispecific binding molecule will have different antigen specificity and therefore different CDR sequences.

Such bivalent binding molecules are also named "biparatopic single domain antibody constructs" (if the immunoglobulin single variable domains consist or essentially consist of single domain antibodies), or "biparatopic VHH constructs" (if the immunoglobulin single variable domains consist or essentially consist of VHHs), respectively, as the two immunoglobulin single variable domains will include two different paratopes.

In the bispecific binding molecule of the invention, one or both of the binding molecules may be bivalent; e.g. the VEGF-binding component may be biparatopic and the Dll4-binding component may be one immunoglobulin single variable domain, or the VEGF-binding component may be one immunoglobulin single variable domain and the Dll4-binding component may be biparatopic.

In bispecific binding molecules of the invention, it is preferably the VEGF-binding component that contains a bivalent VEGF-binding immunoglobulin single variable domain, e.g. a biparatopic VHH.

Such VEGF-binding immunoglobulin single variable domain may be two or more VEGF-binding VHHs, which are

a. identical VHHs that are capable of blocking the interaction between recombinant human VEGF and the recombinant human VEGFR-2 with an inhibition rate of ≥ 60% or

b. different VHHs that bind to non-overlapping epitopes of VEGF, wherein at least one VHH is capable of blocking the interaction between recombinant human VEGF and the recombinant human VEGFR-2 with an inhibition rate of ≥ 60% and wherein at least one VHH is capable of blocking said interaction with an inhibition rate of ≤ 60 %.

Examples for VHHs capable of blocking said interaction with an inhibition rate of ≤ 60 % ("non-receptor blocking" VHHs) are listed in SEQ ID Nos: 45 – 47 and Table 33; a preferred VHH of this type has the sequence shown in SEQ ID NO: 45. Suitable VHHs of this type as components in bispecific binding molecules for human therapy are sequence-optimized variants of VHH with a sequence shown in SEQ ID NO: 45, in particular VHHs with sequences shown in SEQ ID Nos: 65 and 66 and in Table 61, a particularly preferred binding partner in a bivalent VEGF-binding VHH has a sequence shown in SEQ ID NO: 67 (Table 63).

Bivalent anti-VEGF VHH constructs are exemplified in SEQ ID NOs: 48 – 53 and Table 45; bispecific binding molecules for human therapy will contain the respective sequence-optimized variants of these VHHs. Bispecific binding molecules are exemplified in SEQ ID NOs: 68 – 73 (see also Table 66 and Figure 39) and SEQ ID NO: 74 – 80 (see also Table 68 and Figure 40); the examples shown contain parental and affinity-matured VHHs as buildings blocks; bispecific binding molecules for human therapy will contain the respective sequence-optimized variants of these VHHs (as exemplified in SEQ ID NOs: 81 – 89 and Figure 48).

Preferred bispecific binding molecules of the invention comprise

a) as the Dll4-binding component a VHH with a sequence selected from sequences in SEQ ID NO: 35 or 41, and

b) as the VEGF-binding component

   i) a VHH with a sequence shown in SEQ ID NO: 64 or

   ii) a biparatopic VHH comprising a VHH with a sequence shown in SEQ ID NO: 64 and a VHH with a sequence shown in SEQ ID NO:67.

According to preferred embodiments, the VEGF-binding component is located at the N-terminus.

In bispecific binding molecules of the invention that start with EVQ, the N-terminal E of a VHH may be replaced by a D (which is often a result of sequence-optimization) or it may be missing (as for expression in E.coli). This usually applies only to the VHH that is situated N-terminally. Examples for bispecific binding molecules in which the N-terminal E is missing, are given in Figure 48 for the compounds A1, A2 and A3 (SEQ ID Nos: 81 – 83).

According to preferred embodiments, the binding molecules present in the bispecific binding molecules (the Dll4-binding molecules within the Dll4-binding component or the VEGF-binding molecules within the VEGF-binding component or the two adjacent Dll4- and VEGF-binding components) may be connected with each other directly (i.e. without use of a linker) or via a linker. The linker is preferably a linker peptide and will be selected so as to allow binding of the two different binding molecules to each of non-overlapping epitopes of the targets, either within one and the same target molecule, or within two different molecules.

In the case of biparatopic binding molecules, selection of linkers within the Dlll4- or the VEGF-binding component will *inter alia* depend on the epitopes and, specifically, the distance between the epitopes on the target to which the immunoglobulin single variable domains bind, and will be clear to the skilled person based on the disclosure herein, optionally after some limited degree of routine experimentation.

Two binding molecules (two VHHs or domain antibodies or VHH and a domain antibody), or two binding components, may be linked to each other via an additional VHH or domain antibody, respectively (in such binding molecules, the two or more immunoglobulin single variable domains may be linked directly

to said additional immunoglobulin single variable domain or via suitable linkers). Such an additional VHH or domain antibody may for example be a VHH or domain antibody that provides for an increased half-life. For example, the latter VHH or domain antibody may be one that is capable of binding to a (human) serum protein such as (human) serum albumin or (human) transferrin.

Alternatively, the two or more immunoglobulin single variable domains that bind to the respective target may be linked in series (either directly or via a suitable linker) and the additional VHH or domain antibody (which may provide for increased half-life) may be connected directly or via a linker to one of these two or more aforementioned immunoglobulin sequences.

Suitable linkers are described herein in connection with specific polypeptides of the invention and may - for example and without limitation - comprise an amino acid sequence, which amino acid sequence preferably has a length of 9 or more amino acids, more preferably at least 17 amino acids, such as about 20 to 40 amino acids. However, the upper limit is not critical but is chosen for reasons of convenience regarding e.g. biopharmaceutical production of such polypeptides.

The linker sequence may be a naturally occurring sequence or a non-naturally occurring sequence. If used for therapeutic purposes, the linker is preferably non-immunogenic in the subject to which the bispecific binding molecule of the invention is administered.

One useful group of linker sequences are linkers derived from the hinge region of heavy chain antibodies as described in WO 96/34103 and WO 94/04678.

Other examples are poly-alanine linker sequences such as Ala- Ala- Ala.

Further preferred examples of linker sequences are Gly/Ser linkers of different length such as $(gly_xser_y)_z$ linkers, including $(gly_4ser)_3$, $(gly_4ser)_4$, (gly_4ser), (gly_3ser), gly_3, and $(gly_3ser_2)_3$.

Some non-limiting examples of linkers are shown in Figures 40 and 48, e.g. the linkers

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (35GS; SEQ ID NO: 90);

GGGGSGGGS (9GS; SEQ ID NO: 91);

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (40GS; SEQ ID NO: 92).

If a bispecific binding molecule is modified by the attachment of a polymer, for example of a polyethylene glycol PEG (polyethylene glycol) moiety, the linker sequence preferably includes an amino acid residue, such as a cysteine or a lysine, allowing such modification, e.g. PEGylation, in the linker region.

Examples of linkers useful for PEGylation are:

GGGGCGGGS ("GS9,C5", SEQ ID NO:93);

GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS25,C5, SEQ ID NO:94)

GGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGG ("GS27,C14", SEQ ID NO:95),

GGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS35,C15", SEQ ID NO:96), and

GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS35,C5", SEQ ID NO:97).

Furthermore, the linker may also be a poly(ethylene glycol) moiety, as shown in e.g. WO 04/081026.

In another embodiment, the immunoglobulin single variable domains are linked to each other via another moiety (optionally via one or two linkers), such as another polypeptide which, in a preferred but non-limiting embodiment, may be a further immunoglobulin single variable domain as described above. Such moiety may either be essentially inactive or may have a biological effect such as improving the desired properties of the polypeptide or may confer one or more additional desired properties to the polypeptide. For example, and without limitation, the moiety may improve the half-life of the protein or polypeptide, and/or may reduce its immunogenicity or improve any other desired property.

According to a preferred embodiment, a bispecific binding molecule of the invention includes, especially when intended for use or used as a therapeutic agent, a moiety which extends the half-life of the polypeptide of the invention in serum or other body fluids of a patient. The term "half-life" is defined as the time it takes for the serum concentration of the (modified) polypeptide to reduce by 50%, *in vivo,* for example due to degradation of the polypeptide and/or clearance and/or sequestration by natural mechanisms.

More specifically, such half-life extending moiety can be covalently linked to or fused to an immunoglobulin single variable domain and may be, without limitation, an Fc portion, an albumin moiety, a fragment of an albumin moiety, an albumin binding moiety, such as an anti-albumin immunoglobulin single variable domain, a transferrin binding moiety, such as an anti-transferrin immunoglobulin single variable domain, a polyoxyalkylene molecule, such as a polyethylene glycol molecule, an albumin binding peptide or a hydroxyethyl starch (HES) derivative.

In another embodiment, the bispecific binding molecule of the invention comprises a moiety which binds to an antigen found in blood, such as serum albumin, serum immunoglobulins, thyroxine-binding protein, fibrinogen or transferrin, thereby conferring an increased half-life *in vivo* to the resulting polypeptide of the invention. According to a specifically preferred embodiment, such moiety is an albumin-binding immunoglobulin and, especially preferred, an albumin-binding immunoglobulin single variable domain such as an albumin-binding VHH domain.

If intended for use in humans, such albumin-binding immunoglobulin single variable domain preferably binds to human serum albumin and preferably is a humanized albumin-binding VHH domain.

Immunoglobulin single variable domains binding to human serum albumin are known in the art and are described in further detail in e.g. WO 2006/122786. Specifically, useful albumin binding VHHs are ALB 1 and its humanized counterpart, ALB 8 (WO 2009/095489). Other albumin binding VHH domains mentioned in the above patent publication may, however, be used as well.

A specifically useful albumin binding VHH domain is ALB8 which consists of or contains the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 98.

According to a further embodiment of the invention, the two immunoglobulin single variable domains, in preferably VHHs, may be fused to a serum albumin molecule, such as described e.g. in WO01/79271 and WO03/59934. As e.g. described in WO01/79271, the fusion protein may be obtained by conventional recombinant technology: a DNA molecule coding for serum albumin, or a fragment thereof, is joined to the DNA coding for the VEGF-binding molecule, the obtained construct is inserted into a plasmid suitable for expression in the selected host cell, e.g. a yeast cell like Pichia pastoris or a bacterial cell, and the host cell is then transfected with the fused nucleotide sequence and grown

under suitable conditions. The sequence of a useful HSA is shown in SEQ ID NO: 99.

According to another embodiment, a half-life extending modification of a polypeptide of the invention (such modification also reducing immunogenicity of the polypeptide) comprises attachment of a suitable pharmacologically acceptable polymer, such as straight or branched chain poly(ethylene glycol) (PEG) or derivatives thereof (such as methoxypoly(ethylene glycol) or mPEG). Generally, any suitable form of PEGylation can be used, such as the PEGylation used in the art for antibodies and antibody fragments (including but not limited to domain antibodies and scFv's); reference is made, for example, to: Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov. 2 (2003); and WO04/060965.

Various reagents for PEGylation of polypeptides are also commercially available, for example from Nektar Therapeutics, USA, or NOF Corporation, Japan, such as the Sunbright® EA Series, SH Series, MA Series, CA Series, and ME Series, such as Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA, and Sunbright® ME-400MA.

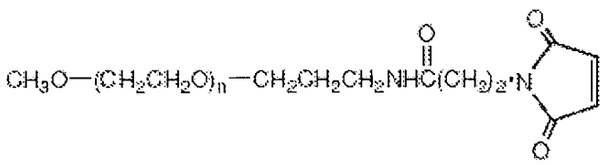
Preferably, site-directed PEGylation is used, in particular via a cysteine-residue (see for example Yang *et al.*, Protein Engineering 16, 761-770 (2003)). For example, for this purpose, PEG may be attached to a cysteine residue that naturally occurs in a polypeptide of the invention, a polypeptide of the invention may be modified so as to suitably introduce one or more cysteine residues for attachment of PEG, or an amino acid sequence comprising one or more cysteine residues for attachment of PEG may be fused to the N- and/or C-terminus of a polypeptide of the invention, all using techniques of protein engineering known per se to the skilled person.

Preferably, for the polypeptides of the invention, a PEG is used with a molecular weight of more than 5 kDa, such as more than 10 kDa and less than 200 kDa, such as less than 100 kDa; for example in the range of 20 kDa to 80 kDa.

With regard to PEGylation, its should be noted that generally, the invention also encompasses any bispecific binding molecule that has been PEGylated at one or more amino acid positions, preferably in such a way that said PEGylation either (1) increases the half-life in vivo; (2) reduces immunogenicity; (3) provides one or more further beneficial properties known per se for PEGylation; (4) does not essentially affect the affinity of the polypeptide for its target (e.g. does not reduce said affinity by more than 50 %, and more preferably not by more than 10%, as determined by a suitable assay described in the art); and/or (4) does not affect any of the other desired properties of the bispecific binding molecules of the invention. Suitable PEG-groups and methods for attaching them, either specifically or non-specifically, will be clear to the skilled person. Various reagents for PEGylation of polypeptides are also commercially available, for example from Nektar Therapeutics, USA, or NOF Corporation, Japan, such as the Sunbright® EA Series, SH Series, MA Series, CA Series, and ME Series, such as Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA, and Sunbright® ME-400MA.

According to an especially preferred embodiment of the invention, a PEGylated polypeptide of the invention includes one PEG moiety of linear PEG having a molecular weight of 40 kDa or 60 kDa, wherein the PEG moiety is attached to the polypeptide in a linker region and, specifically, at a Cys residue at position 5 of a GS9-linker peptide as shown in SEQ ID NO:93, at position 14 of a GS27-linker peptide as shown in SEQ ID NO:95, or at position 15 of a GS35-linker peptide as shown in SEQ ID NO:96, or at position 5 of a 35GS-linker peptide as shown in SEQ ID NO:97.

A bispecific binding molecule of the invention may be PEGylated with one of the PEG reagents as mentioned above, such as "Sunbright® ME-400MA", as shown in the following chemical formula:



Bispecific binding molecules that contain linkers and/or half-life extending functional groups are shown in SEQ ID NO: 81 and in Figure 48.

According to another embodiment, the immunoglobulin single variable domains are domain antibodies, as defined herein.

Immunoglobulin single variable domains present in the bispecific binding molecules of the invention may also have sequences that correspond to the amino acid sequence of a naturally occurring VH domain that has been "camelized", i.e. by replacing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of a naturally occurring variable heavy chain from a conventional 4-chain antibody by one or more amino acid residues that occur at the corresponding position(s) in a VHH domain of a heavy chain antibody. This can be performed in a manner known per se, which will be clear to the skilled person, and reference is additionally be made to WO 94/04678. Such camelization may preferentially occur at amino acid positions which are present at the VH-VL interface and at the so-called Camelidae Hallmark residues (see for example also WO 94/04678). A detailled description of such "humanization" and "camelization" techniques and preferred framework region sequences consistent therewith can additionally be taken from e.g. pp. 46 and pp. 98 of WO 2006/040153 and pp. 107 of WO 2006/122786.

The binding molecules have specificity for Dll4 or VEGF, respectively, in that they comprise one or more immunoglobulin single variable domains specifically binding to one or more epitopes within the Dll4 molecule or within the VEGF molecule, respectively.

Specific binding of a binding molecule to its antigen Dll4 or VEGF can be determined in any suitable manner known *per se*, including, for example, the assays described herein, Scatchard analysis and/or competitive binding assays, such as radioimmunoassays (RIA), enzyme immunoassays (EIA and ELISA) and sandwich competition assays, and the different variants thereof known per se in the art.

With regard to the antigen Dll4 or VEGF, respectively, an immunoglobulin single variable domain is not limited with regard to the species. Thus, the immunoglobulin single variable domains preferably bind to human Dll4 or to human VEGF, respectively, if intended for therapeutic purposes in humans. However, immunoglobulin single variable domains that bind to Dll4 or VEGF, respectively, from another mammalian species, or polypeptides containing them, are also within the scope of the invention. An immunoglobulin single variable domain binding to one species form of Dll4 or VEGF may cross-react with the respective antigen from one or more other species. For example, immunoglobulin single variable domains binding to the human antigen may exhibit cross reactivity with the respective antigen from one or more other species of primates and/or with the antigen from one or more species of animals that are used in animal models for diseases, for example monkey (in particular Cynomolgus or Rhesus), mouse, rat, rabbit, pig, dog or) and in particular in animal models for diseases and disorders that can be modulated by inhibition of Dll4 (such as the species and animal models mentioned herein). Immunoglobulin single variable domains of the invention that show such cross-reactivity are advantageous in a research and/or drug

35

development, since it allows the immunoglobulin single variable domains of the invention to be tested in acknowledged disease models such as monkeys, in particular Cynomolgus or Rhesus, or mice and rats.

Also, the binding molecules are not limited to or defined by a specific domain or an antigenic determinant of the antigen against which they are directed. Preferably, in view of cross-reactivity with one or more antigen molecules from species other than human that is/are intended for use as an animal model during development of a therapeutic Dll4/VEGF antagonist, a binding molecule recognizes an epitope in a region of the the respective antigen that has a high degree of identity with the human antigen. By way of example, in view of using a mouse model, an anti-Dll4 immunoglobulin single variable domain contained in the bispecific binding molecules of the invention recognizes an epitope which is, totally or in part, located within the EGF-2 domain of Dll4, which shows a high identity between human and mouse.

Therefore, according to a preferred embodiment, the bispecific binding molecule of the invention comprises a Dll4-binding molecule which is an immunoglobulin single variable domain that is selected from the group that binds to an epitope that is totally or partially contained within the EGF-2 domain that corresponds to amino acid residues 252-282 of SEQ ID NO:101.

If a bispecific binding molecule of the invention contains a biparatopic Dll4-binding molecule, which contains more than one immunoglobulin single variable domain, at least one of the immunoglobulin single variable domain components binds to the epitope within the EGF-2 domain, as defined above. Preferably, the VEGF-binding component binds to the VEGF isoforms VEGF165 and/or VEGF121.

Preferably, an immunoglobulin single variable domain that is a component of a bispecific binding molecule of the invention binds to Dll4 or to VEGF,

respectively, with an affinity less than 500 nM, preferably less than 200 nM, more preferably less than 10 nM, such as less than 500 pM (as determined by Surface Plasmon Resonance analysis, as described in Example 5.7).

Preferably, immunoglobulin single variable domains contained in the bispecific binding molecules of the invention have IC_{50} values, as measured in a competition ELISA assay as described in Example 5.1. in the range of 10^{-6} to 10^{-10} moles/litre or less, more preferably in the range of 10^{-8} to 10^{-10} moles/litre or less and even more preferably in the range of 10^{-9} to 10^{-10} moles/litre or less.

According to a non-limiting but preferred embodiment of the invention, Dll4- or VEGF-binding immunoglobulin single variable domains contained in the bispecific binding molecules of the invention bind to Dll4 or VEGF, respectively, with an dissociation constant (K_D) of 10^{-5} to 10^{-12} moles/liter (M) or less, and preferably 10^{-7} to 10^{-12} moles/liter (M) or less and more preferably 10^{-8} to 10^{-12} moles/liter (M), and/or with an association constant (K_A) of at least 10^7 M^{-1}, preferably at least 10^8 M^{-1}, more preferably at least 10^9 M^{-1}, such as at least 10^{12} M^{-1}; and in particular with a K_D less than 500 nM, preferably less than 200 nM, more preferably less than 10 nM, such as less than 500 pM. The K_D and K_A values of the immunoglobulin single variable domain of the invention against Dll4 can be determined.

In another aspect, the invention relates to nucleic acid molecules that encode bispecific binding molecules of the invention. Such nucleic acid molecules will also be referred to herein as "nucleic acids of the invention" and may also be in the form of a genetic construct, as defined herein. A nucleic acid of the invention may be genomic DNA, cDNA or synthetic DNA (such as DNA with a codon usage that has been specifically adapted for expression in the intended host cell or host organism). According to one embodiment of the invention, the

nucleic acid of the invention is in essentially isolated form, as defined hereabove.

The nucleic acid of the invention may also be in the form of, may be present in and/or may be part of a vector, such as for example a plasmid, cosmid or YAC. The vector may especially be an expression vector, i.e. a vector that can provide for expression of the Dll4-binding molecule *in vitro* and/or *in vivo* (i.e. in a suitable host cell, host organism and/or expression system). Such expression vector generally comprises at least one nucleic acid of the invention that is operably linked to one or more suitable regulatory elements, such as promoter(s), enhancer(s), terminator(s), and the like. Such elements and their selection in view of expression of a specific sequence in a specific host are common knowledge of the skilled person. Specific examples of regulatory elements and other elements useful or necessary for expressing Dll4-binding molecules of the invention, such as promoters, enhancers, terminators, integration factors, selection markers, leader sequences, reporter genes, and the like, are disclosed e.g. on pp. 131 to 133 of WO 2006/040153.

The nucleic acids of the invention may be prepared or obtained in a manner known *per se* (e.g. by automated DNA synthesis and/or recombinant DNA technology), based on the information on the amino acid sequences for the polypeptides of the invention given herein, and/or can be isolated from a suitable natural source.

In another aspect, the invention relates to host cells that express or that are capable of expressing one or more bispecific binding molecules of the invention; and/or that contain a nucleic acid of the invention. According to a particularly preferred embodiment, said host cells are bacterial cells; other useful cells are yeast cells, fungal cells or mammalian cells.

Suitable bacterial cells include cells from gram-negative bacterial strains such as strains of *Escherichia coli*, *Proteus*, and *Pseudomonas*, and gram-positive bacterial strains such as strains of *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. Suitable fungal cell include cells from species of *Trichoderma*, *Neurospora*, and *Aspergillus*. Suitable yeast cells include cells from species of *Saccharomyces* (for example *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (for example *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (for example *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*), and *Hansenula*.

Suitable mammalian cells include for example CHO cells, BHK cells, HeLa cells, COS cells, and the like. However, amphibian cells, insect cells, plant cells, and any other cells used in the art for the expression of heterologous proteins can be used as well.

The invention further provides methods of manufacturing a bispecific binding molecule of the invention, such methods generally comprising the steps of:

- culturing host cells comprising a nucleic acid capable of encoding a bispecific binding molecule under conditions that allow expression of the bispecific binding molecule of the invention; and

- recovering or isolating the polypeptide expressed by the host cells from the culture; and

- optionally further purifying and/or modifying and/or formulating the bispecific binding molecule of the invention.

For production on an industrial scale, preferred host organisms include strains of *E. coli*, *Pichia pastoris*, and *S. cerevisiae* that are suitable for large scale expression, production and fermentation, and in particular for large scale pharmaceutical expression, production and fermentation.

The choice of the specific expression system depends in part on the requirement for certain post-translational modifications, more specifically glycosylation. The production of a bispecific binding molecule of the invention for which glycosylation is desired or required would necessitate the use of mammalian expression hosts that have the ability to glycosylate the expressed protein. In this respect, it will be clear to the skilled person that the glycosylation pattern obtained (i.e. the kind, number and position of residues attached) will depend on the cell or cell line that is used for the expression.

Bispecific binding molecules of the invention may be produced either in a cell as set out above intracellullarly (e.g. in the cytosol, in the periplasma or in inclusion bodies) and then isolated from the host cells and optionally further purified; or they can be produced extracellularly (e.g. in the medium in which the host cells are cultured) and then isolated from the culture medium and optionally further purified.

Methods and reagents used for the recombinant production of polypeptides, such as specific suitable expression vectors, transformation or transfection methods, selection markers, methods of induction of protein expression, culture conditions, and the like, are known in the art. Similarly, protein isolation and purification techniques useful in a method of manufacture of a polypeptide of the invention are well known to the skilled person.

In a further aspect, the invention relates to a peptide with an amino acid sequence selected from amino acid sequences shown in SEQ ID NOs: 1 to 166, SEQ ID NOs: 333 to 353, or SEQ ID NOs: 375 to 395, respectively, and a nucleic acid molecule encoding same.

These peptides correspond to CDR3s derived from the VHHs of the invention. They, in particular the nucleic acid molecules encoding them, are useful for CDR grafting in order to replace a CDR3 in an immunoglobulin chain, or for

insertion into a non-immunoglobulin scaffold, e.g. a protease inhibitor, DNA-binding protein, cytochrome b562, a helix-bundle protein, a disulfide-bridged peptide, a lipocalin or an anticalin, thus conferring target-binding properties to such scaffold. The method of CDR-grafting is well known in the art and has been widely used, e.g. for humanizing antibodies (which usually comprises grafting the CDRs from a rodent antibody onto the Fv frameworks of a human antibody).

In order to obtain an immunoglobulin or a non-immunoglobulin scaffold containing a CDR3 of the invention, the DNA encoding such molecule may be obtained according to standard methods of molecular biology, e.g. by gene synthesis, by oligonucleotide annealing or by means of overlapping PCR fragments, as e.g. described by Daugherty *et al.*, 1991, Nucleic Acids Research, Vol. 19, 9, 2471 – 2476. A method for inserting a VHH CDR3 into a non-immunoglobulin scaffold has been described by Nicaise *et al.*, 2004, Protein Science, 13, 1882 – 1891.

The invention further relates to a product or composition containing or comprising at least one bispecific binding molecule of the invention and optionally one or more further components of such compositions known *per se*, i.e. depending on the intended use of the composition.

For pharmaceutical use, a bispecific binding molecule of the invention or a polypeptide containing same may be formulated as a pharmaceutical preparation or composition comprising at least one bispecific binding molecule of the invention and at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient and/or adjuvant, and optionally one or more further pharmaceutically active polypeptides and/or compounds. By means of non-limiting examples, such a formulation may be in a form suitable for oral administration, for parenteral administration (such as by intravenous, intramuscular or subcutaneous injection or intravenous infusion), for topical administration, for

3B

administration by inhalation, by a skin patch, by an implant, by a suppository, etc. Such suitable administration forms - which may be solid, semi-solid or liquid, depending on the manner of administration - as well as methods and carriers for use in the preparation thereof, will be clear to the skilled person, and are further described herein.

Thus, in a further aspect, the invention relates to a pharmaceutical composition that contains at least one bispecific binding molecule, in particular one immunoglobulin single variable domain of the invention or a polypeptide containing same and at least one suitable carrier, diluent or excipient (i.e. suitable for pharmaceutical use), and optionally one or more further active substances.

The bispecific binding molecules of the invention may be formulated and administered in any suitable manner known per se: Reference, in particular for the immunoglobulin single variable domains, is for example made to WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 and WO 08/020079, as well as to the standard handbooks, such as Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005); or the Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (see for example pages 252-255).

For example, an immunoglobulin single variable domain of the invention may be formulated and administered in any manner known per se for conventional antibodies and antibody fragments (including ScFv's and diabodies) and other pharmaceutically active proteins. Such formulations and methods for preparing the same will be clear to the skilled person, and for example include preparations suitable for parenteral administration (for example intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, intraluminal, intra-arterial or

intrathecal administration) or for topical (i.e. transdermal or intradermal) administration.

Preparations for parenteral administration may for example be sterile solutions, suspensions, dispersions or emulsions that are suitable for infusion or injection. Suitable carriers or diluents for such preparations for example include, without limitation, sterile water and pharmaceutically acceptable aqueous buffers and solutions such as physiological phosphate-buffered saline, Ringer's solutions, dextrose solution, and Hank's solution; water oils; glycerol; ethanol; glycols such as propylene glycol or as well as mineral oils, animal oils and vegetable oils, for example peanut oil, soybean oil, as well as suitable mixtures thereof. Usually, aqueous solutions or suspensions will be preferred.

Thus, the bispecific binding molecule of the invention may be systemically administered, e.g., orally, in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle such as an inert diluent or an assimilable edible carrier. For oral therapeutic administration, the bispecific binding molecule of the invention may be combined with one or more excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. Such compositions and preparations should contain at least 0.1% of the bispecific binding molecule of the invention. Their percentage in the compositions and preparations may, of course, be varied and may conveniently be between about 2 to about 60% of the weight of a given unit dosage form. The amount of the bispecific binding molecule of the invention in such therapeutically useful compositions is such that an effective dosage level will be obtained.

The tablets, pills, capsules, and the like may also contain binders, excipients, disintegrating agents, lubricants and sweetening or flavouring agents, for example those mentioned on pages 143-144 of WO 08/020079. When the unit

dosage form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier, such as a vegetable oil or a polyethylene glycol. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the solid unit dosage form. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with gelatin, wax, shellac or sugar and the like. A syrup or elixir may contain the bispecific binding molecules of the invention, sucrose or fructose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavoring such as cherry or orange flavor. Of course, any material used in preparing any unit dosage form should be pharmaceutically acceptable and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the bispecific binding molecules of the invention may be incorporated into sustained-release preparations and devices.

Preparations and formulations for oral administration may also be provided with an enteric coating that will allow the constructs of the invention to resist the gastric environment and pass into the intestines. More generally, preparations and formulations for oral administration may be suitably formulated for delivery into any desired part of the gastrointestinal tract. In addition, suitable suppositories may be used for delivery into the gastrointestinal tract.

The bispecific binding molecules of the invention may also be administered intravenously or intraperitoneally by infusion or injection, as further described on pages 144 and 145 of WO 08/020079.

For topical administration of the bispecific binding molecules of the invention, it will generally be desirable to administer them to the skin as compositions or formulations, in combination with a dermatologically acceptable carrier, which may be a solid or a liquid, as further described on page 145 of WO 08/020079.

Generally, the concentration of the bispecific binding molecules of the invention in a liquid composition, such as a lotion, will be from about 0.1-25 wt-%, preferably from about 0.5-10 wt-%. The concentration in a semi-solid or solid composition such as a gel or a powder will be about 0.1-5 wt-%, preferably about 0.5-2.5 wt-%.

The amount of the bispecific binding molecules of the invention required for use in treatment will vary not only with the particular bispecific binding molecule selected, but also with the route of administration, the nature of the condition being treated and the age and condition of the patient and will be ultimately at the discretion of the attendant physician or clinician. Also, the dosage of the bispecific binding molecules of the invention varies depending on the target cell, tumor, tissue, graft, or organ.

The desired dose may conveniently be presented in a single dose or as divided doses administered at appropriate intervals, for example, as two, three, four or more sub-doses per day. The sub-dose itself may be further divided, *e.g.*, into a number of discrete loosely spaced administrations; such as multiple inhalations from an insufflator or by application of a plurality of drops into the eye.

An administration regimen may include long-term, daily treatment. By "long-term" is meant at least two weeks and preferably, several weeks, months, or years of duration. Necessary modifications in this dosage range may be determined by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation given the teachings herein. See Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. The dosage can also be adjusted by the individual physician in the event of any complication.

According to a further embodiment, the invention relates to the use of bispecific binding molecules, e.g. immunoglobulin single variable domains or polypeptides containing them, for therapeutic purposes, such as

- for the prevention, treatment and/or alleviation of a disorder, disease or condition, especially in a human being, that is associated with Dll4-mediated effects on angiogenesis or that can be prevented, treated or alleviated by modulating the Notch signaling pathway with a Dll4-binding molecule,

- in a method of treatment of a patient in need of such therapy, such method comprising administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically active amount of at least one bispecific binding molecule of the invention, e.g. an immunoglobulin single variable domain, or a pharmaceutical composition containing same;

- for the preparation of a medicament for the prevention, treatment or alleviation of disorders, diseases or conditions associated with Dll4-mediated effects on angiogenesis;

- as an active ingredient in a pharmaceutical composition or medicament used for the above purposes.

According to a specific aspect, said disorder disorder, disease or condition is a cancer or cancerous disease, as defined herein.

According to another aspect, the disease is an eye disease associated with associated with Dll4-mediated effects on angiogenesis or which can be treated or alleviated by modulating the Notch signaling pathway with a Dll4-binding molecule.

Depending on the cancerous disease to be treated, a bispecific binding molecule of the invention may be used on its own or in combination with one or more additional therapeutic agents, in particular selected from

chemotherapeutic agents like DNA damaging agents or therapeutically active compounds that inhibit angiogenesis, signal transduction pathways or mitotic checkpoints in cancer cells.

The additional therapeutic agent may be administered simultaneously with, optionally as a component of the same pharmaceutical preparation, or before or after administration of the bispecific binding molecule.

In certain embodiments, the additional therapeutic agent may be, without limitation (and in the case of the receptors, including the respective ligands), one or more inhibitors selected from the group of inhibitors of EGFR, VEGFR, HER2-neu, Her3, AuroraA, AuroraB, PLK and PI3 kinase, FGFR, PDGFR, Raf, KSP, PDK1, PTK2, IGF-R or IR.

Further examples of additional therapeutic agents are inhibitors of CDK, Akt, src/bcr abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, hedgehog antagonists, inhibitors of JAK/STAT, Mek, mTor, NFkappaB, the proteasome, Rho, an inhibitor of wnt signaling or an inhibitor of the ubiquitination pathway or another inhibitor of the Notch signaling pathway.

Examples for Aurora inhibitors are, without limitation, PHA-739358, AZD-1152, AT 9283, CYC-116, R-763, VX-680, VX-667, MLN-8045, PF-3814735.

An example for a PLK inhibitor is GSK-461364.

Examples for raf inhibitors are BAY-73-4506 (also a VEGFR inhibitor), PLX 4032, RAF-265 (also in addition a VEGFR inhibitor), sorafenib (also in addition a VEGFR inhibitor), and XL 281.

Examples for KSP inhibitors are ispinesib, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK 246053A, GSK-923295, MK-0731, and SB-743921.

Examples for a src and/or bcr-abl inhibitors are dasatinib, AZD-0530, bosutinib, XL 228 (also an IGF-1R inhibitor), nilotinib (also a PDGFR and cKit inhibitor), imatinib (also a cKit inhibitor), and NS-187.

An example for a PDK1 inhibitor is BX-517.

An example for a Rho inhibitor is BA-210.

Examples for PI3 kinase inhibitors are PX-866, BEZ-235 (also an mTor inhibitor), XL 418 (also an Akt inhibitor), XL-147, and XL 765 (also an mTor inhibitor).

Examples for inhibitors of cMet or HGF are XL-184 (also an inhibitor of VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (also an inhibitor of VEGFR), MGCD-265 (also an inhibitor of VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, and AV-299.

An example for a c-Myc inhibitor is CX-3543.

Examples for Flt3 inhibitors are AC-220 (also an inhibitor of cKit and PDGFR), KW 2449, lestaurtinib (also an inhibitor of VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (also an inhibitor of JAK2), XL-999 (also an inhibitor of cKit, FGFR, PDGFR and VEGFR), sunitinib (also an inhibitor of PDGFR, VEGFR and cKit), and tandutinib (also an inhibitor of PDGFR, and cKit).

Examples for HSP90 inhibitors are tanespimycin, alvespimycin, IPI-504 and CNF 2024.

Examples for JAK/STAT inhibitors are CYT-997 (also interacting with tubulin), TG 101348 (also an inhibitor of Flt3), and XL-019.

Examples for Mek inhibitors are ARRY-142886, PD-325901, AZD-8330, and XL 518.

Examples for mTor inhibitors are temsirolimus, AP-23573 (which also acts as a VEGF inhibitor), everolimus (a VEGF inhibitor in addition). XL-765 (also a PI3 kinase inhibitor), and BEZ-235 (also a PI3 kinase inhibitor).

Examples for Akt inhibitors are perifosine, GSK-690693, RX-0201, and triciribine.

Examples for cKit inhibitors are AB-1010, OSI-930 (also acts as a VEGFR inhibitor), AC-220 (also an inhibitor of Flt3 and PDGFR), tandutinib (also an inhibitor of Flt3 and PDGFR), axitinib (also an inhibitor of VEGFR and PDGFR), XL-999 (also an inhibitor of Flt3, PDGFR, VEGFR, FGFR), sunitinib (also an inhibitor of Flt3, PDGFR, VEGFR), and XL-820 (also acts as a VEGFR- and PDGFR inhibitor), imatinib (also a bcr-abl inhibitor), nilotinib (also an inhibitor of bcr-abl and PDGFR).

Examples for hedgehog antagonists are IPI-609 and CUR-61414.

Examples for CDK inhibitors are seliciclib, AT-7519, P-276, ZK-CDK (also inhibiting VEGFR2 and PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, and AG 024322.

Examples for proteasome inhibitors are bortezomib, carfilzomib, and NPI-0052 (also an inhibitor of NFkappaB).

An example for an NFkappaB pathway inhibitor is NPI-0052.

An example for an ubiquitination pathway inhibitor is HBX-41108.

In preferred embodiments, the additional therapeutic agent is an anti-angiogenic agent.

Examples for anti-angiogenic agents are inhibitors of the FGFR, PDGFR and VEGFR or the respective ligands (e.g VEGF inhibitors like pegaptanib or the anti-VEGF antibody bevacizumab), and thalidomides, such agents being

selected from, without limitation, bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU-14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (also an inhibitor of CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiDs (immunomodulatory drugs), thalidomide derivative CC-4047, lenalidomide, ENMD 0995, IMC-D11, Ki 23057, brivanib, cediranib, XL-999 (also an inhibitor of cKit and Flt3), 1B3, CP 868596, IMC 3G3, R-1530 (also an inhibitor of Flt3), sunitinib (also an inhibitor of cKit and Flt3), axitinib (also an inhibitor of cKit), lestaurtinib (also an inhibitor of Flt3 and PKC), vatalanib, tandutinib (also an inhibitor of Flt3 and cKit), pazopanib, GW 786034, PF-337210, IMC-1121B, AVE-0005, AG-13736, E-7080, CHIR 258, sorafenib tosylate (also an inhibitor of Raf), RAF-265 (also an inhibitor of Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (also an inhibitor of EGFR and Her2), BAY-57-9352 (also an inhibitor of Raf), BAY-73-4506 (also an inhibitor of Raf), XL 880 (also an inhibitor of cMet), XL-647 (also an inhibitor of EGFR and EphB4), XL 820 (also an inhibitor of cKit), and nilotinib (also an inhibitor of cKit and brc-abl).

The additional therapeutic agent may also be selected from EGFR inhibitors, it may be a small molecule EGFR inhibitor or an anti-EGFR antibody. Examples for anti-EGFR antibodies, without limitation, are cetuximab, panitumumab, matuzumab; an example for a small molecule EGFR inhibitor is gefitinib. Another example for an EGFR modulator is the EGF fusion toxin.

Among the EGFR and Her2 inhibitors useful for combination with the bispecific binding molecule of the invention are lapatinib, gefitinib, erlotinib, cetuximab, trastuzumab, nimotuzumab, zalutumumab, vandetanib (also an inhibitor of VEGFR), pertuzumab, XL-647, HKI-272, BMS-599626 ARRY-334543, AV 412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (also an inhibitor of VEGFR), ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab.

Other agents that may be advantageously combined in a therapy with the bispecific binding molecule of the invention are tositumumab and ibritumomab

tiuxetan (two radiolabelled anti-CD20 antibodies), alemtuzumab (an anti-CD52 antibody), denosumab, (an osteoclast differentiation factor ligand inhibitor), galiximab (a CD80 antagonist), ofatumumab (a CD20 inhibitor), zanolimumab (a CD4 antagonist), SGN40 (a CD40 ligand receptor modulator), rituximab (a CD20 inhibitor) or mapatumumab (a TRAIL-1 receptor agonist).

Other chemotherapeutic drugs that may be used in combination with the bispecific binding molecules of the present invention are selected from, but not limited to hormones, hormonal analogues and antihormonals (e.g. tamoxifen, toremifene, raloxifene, fulvestrant, megestrol acetate, flutamide, nilutamide, bicalutamide, cyproterone acetate, finasteride, buserelin acetate, fludrocortisone, fluoxymesterone, medroxyprogesterone, octreotide, arzoxifene, pasireotide, vapreotide), aromatase inhibitors (e.g. anastrozole, letrozole, liarozole, exemestane, atamestane, formestane), LHRH agonists and antagonists (e.g. goserelin acetate, leuprolide, abarelix, cetrorelix, deslorelin, histrelin, triptorelin), antimetabolites (e.g. antifolates like methotrexate, pemetrexed, pyrimidine analogues like 5 fluorouracil, capecitabine, decitabine, nelarabine, and gemcitabine, purine and adenosine analogues such as mercaptopurine thioguanine, cladribine and pentostatin, cytarabine, fludarabine); antitumor antibiotics (e.g. anthracyclines like doxorubicin, daunorubicin, epirubicin and idarubicin, mitomycin-C, bleomycin dactinomycin, plicamycin, mitoxantrone, pixantrone, streptozocin); platinum derivatives (e.g. cisplatin, oxaliplatin, carboplatin, lobaplatin, satraplatin); alkylating agents (e.g. estramustine, meclorethamine, melphalan, chlorambucil, busulphan, dacarbazine, cyclophosphamide, ifosfamide, hydroxyurea, temozolomide, nitrosoureas such as carmustine and lomustine, thiotepa); antimitotic agents (e.g. vinca alkaloids like vinblastine, vindesine, vinorelbine, vinflunine and vincristine; and taxanes like paclitaxel, docetaxel and their formulations, larotaxel; simotaxel, and epothilones like ixabepilone, patupilone, ZK-EPO); topoisomerase inhibitors (e.g. epipodophyllotoxins like

93

etoposide and etopophos, teniposide, amsacrine, topotecan, irinotecan) and miscellaneous chemotherapeutics such as amifostine, anagrelide, interferone alpha, procarbazine, mitotane, and porfimer, bexarotene, celecoxib.

The efficacy of bispecific binding molecules of the invention or polypeptides containing them, and of compositions comprising the same, can be tested using any suitable *in vitro* assay, cell- based assay, *in vivo* assay and/or animal model known per se, or any combination thereof, depending on the specific disease or disorder of interest. Suitable assays and animal models will be clear to the skilled person, and for example include the assays described herein and used in the Examples below, e.g. a proliferation assay.

Brief description of the Figures:

Figure 1: Amino acid sequence alignment of human, rhesus and cynomolgus DLL4

Figure 2: Human and mouse DLL4 deletion mutants (amino acid domain boundaries in superscript).

Figure 3: Purified VHHs block the hDLL4/hNotch1-Fc interaction (ELISA).

Figure 4: Purified VHHs block the hDLL4/hNotch1-Fc interaction (AlphaScreen).

Figure 5: Purified VHHs block the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc interaction (FMAT).

Figure 6: Purified VHHs block the DLL4 mediated Notch1 cleavage (reporter).

Figure 7: Binding of purified VHHs to recombinant human and mouse DLL4 (ELISA).

Figure 8: Binding of purified VHHs to recombinant human DLL1 and human Jagged-1 (ELISA).

Figure 9: Binding of purified VHHs to human/mouse/cynomolgus DLL4 (FACS).

Figure 10: Affinity-matured VHHs block the hDLL4/hNotch1-Fc interaction (ELISA).

Figure 11: **A**ffinity-matured VHHs block the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc interaction (FMAT).

Figure 12: Binding of purified VHHs to human/mouse DLL4 (ELISA)

Figure 13: Binding of purified affinity-matured VHHs to recombinant human DLL1 and human Jagged-1 (ELISA).

Figure 14: Binding of purified VHHs to human/mouse/cynomolgus DLL4 (FACS).

Figure 15: Evaluation of VHHs effects on Dll4-mediated inhibition of HUVEC proliferation.

Figure 16: Affinity matured VHHs in DLL4-mediated reporter assay

Figure 17: A) Sequence alignment of VHH DLLBII129B05 to the human VH3/JH germline sequence.

B) Sequence alignment of VHH DLLBII136C07 to the human VH3/JH5 germline sequence.

Figure 18: A) Purified sequence optimized VHH variants of DLLBII129B05 blocking CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc interaction (FMAT)

B) Purified sequence optimized VHH variants of DLLBII136C07 blocking CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc interaction (FMAT)

Figure 19: Purified sequence optimized VHHs blocking DLL4 mediated Notch1 cleavage (reporter assay)

Figure 20: Purified monovalent VHHs block the hVEGF165/hVEGFR2-Fc interaction (ELISA)

Figure 21: Purified monovalent VHHs block the hVEGF165/hVEGFR1-Fc interaction (ELISA)

Figure 22: Purified monovalent VHHs block the hVEGF165/hVEGFR2-Fc interaction (AlphaScreen)

Figure 23: Purified monovalent VHHs block the hVEGF165/hVEGFR1-Fc interaction (AlphaScreen)

Figure 24: Binding of monovalent VHHs to recombinant human and mouse VEGF (ELISA)

Figure 25: Binding of monovalent VHHs to human VEGF121

Figure 26: Purified VHHs do not bind to VEGFB, VEGFC, VEGFD and PlGF

Figure 27: Formatted VHHs block hVEGF165/hVEGFR2-Fc interaction (ELISA)

Figure 28: Formatted VHHs block hVEGF165/hVEGFR1-Fc interaction (ELISA)

Figure 29: Formatted VHHs block hVEGF165/hVEGFR2-Fc interaction (AlphaScreen)

Figure 30: Formatted VHHs block hVEGF165/hVEGFR1-Fc interaction (AlphaScreen)

Figure 31: Formatted VHHs block mVEGF164/mVEGFR2-Fc interaction (AlphaScreen)

Figure 32: Formatted VHHs bind to mouse and human VEGF

Figure 33: Formatted VHHs do not bind to VEGFB, VEGFC, VEGFD and PlGF

Figure 34: Formatted VHHs bind to VEGF121

Figure 35: Sequence alignment of VHH VEGFBII23B04 with human VH3/JH germline consensus sequence

Figure 36: VHH variants of VEGFBII23B4 block the hVEGF165/hVEGFR2-Fc interaction(AlphaScreen)

Figure 37: Sequence-optimized clones of VEGFBII23B4 block the hVEGF165/hVEGFR2-Fc interaction (AlphaScreen)

Figure 38: Sequence alignment of VHH VEGFBII5B5 with human VH3/JH germline consensus sequence

Figure 39: Format of cycle 1 bispecific VEGF-DLL4 VHHs.

Figure 40: Format of cycle 2 bispecific VEGF-DLL4 VHHs.

Figure 41: Bispecific VHHs (cycle 1) in the VEGF/VEGFR2 AlphaScreen assay (in the presence or absence of 5 μM HSA)

Figure 42: Bispecific VHHs (cycle 1) in the VEGF/VEGFR1 AlphaScreen assay (in presence or absence of 5 μM HSA)

Figure 43: Bispecific VHHs (cycle 1) in the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT assay (in presence or absence of 25 μM HSA)

Figure 44: Bispecific VHHs (cycle 2) in the VEGF/VEGFR2 AlphaScreen assay (in presence or absence of 5 μM HSA)

Figure 45: Bispecific VHHs (cycle 2) in the VEGF/VEGFR1 AlphaScreen assay (in the presence or absence of 5 μM HSA)

Figure 46: Bispecific VHHs (cycle 2) in the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT assay (in the presence or absence of 25 μM HSA)

Figure 47: Bispecific VHHs (cycle 2) in the DLL4 mediated reporter assay (in the presence or absence of 175 μM HSA)

Figure 48: Format of sequence-optimized bispecific VEGF-DLL4 VHHs

Figure 49: Bispecific VHHs (cycle 3) in the VEGF/VEGFR2 AlphaScreen assay (in presence or absence of 5 μM HSA)

Figure 50: Bispecific VHHs (cycle 3) in the VEGF/VEGFR1 AlphaScreen assay (in presence or absence of 5 μM HSA)

Figure 51: Bispecific VHHs (cycle 3) in the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT assay (in thr presence or absence of 25 µM HSA)

Figure 52: Efficacy of selected VHHs in a mouse model of human colon cancer (SW620 model)

A: SW620 tumor growth kinetics

B: Absolute tumor volumes at the end of the study on day 21

C: change of body weight over time

Materials and methods

a) *Generation of CHO and HEK293 cell lines overexpressing human, mouse and cynomolgus Dll4*

The cDNAs encoding human (SEQ ID NO: 101; NM_019074.2) and mouse Dll4 (NM_019454.3) are amplified from a Human Adult Normal Tissue Heart cDNA library (BioChain, Hayward, CA, USA) and a Mouse Heart Tissue cDNA library (isolated from C57/Bl6 strain), respectively, using oligonucleotides designed in the 5' and 3' UTR of the corresponding sequence. Amplicons are cloned into the mammalian expression vector pCDNA3.1(+)-neo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Cynomolgus Dll4 cDNA is amplified from a Cynomolgus Normal Tissue Heart cDNA library (BioChain, Hayward, CA, USA), using primers designed on the 5' and 3' UTR of the Dll4 encoding sequence of the closely related species rhesus (Macaca mulatta Dll4, SEQ ID NO:102; XM_001099250.1) (see Figure 1). The final amplicon is cloned in the mammalian expression vector pCDNA3.1(+)-neo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The amino acid sequence of cynomolgus Dll4 is shown to be 100% identical to rhesus, and 99% identical to human (see Figure 1; differences from the human sequence are indicated as bold-underlined).

To establish Chinese Hamster Ovary (CHO) cells overexpressing human Dll4, mouse Dll4 or cynomolgus Dll4, parental CHO cells are electroporated with pCDNA3.1(+)-neo-hDll4, pcDNA3.1(+)-neo-mDll4 or pcDNA3.1(+)-neo-cDll4, respectively. Human Embyonic Kidney (HEK293) cells overexpressing human Dll4 and mouse Dll4 are generated by lipid-mediated transfection with Fugene (Roche) of pCDNA3.1(+)-neo-hDll4 or mDll4 plasmids, respectively, in the HEK293 parental cell line. For all conditions, transfectants are selected by adding 1 mg/mL geneticin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

b) Generation of monoclonal anti-Dll4 IgG and Fab fragment

In US 2008/0014196; Genentech) a human/mouse cross-reactive Dll4 mAb is described that is used by Ridgway *et al.* (2006) to show additive effects of VEGF mAb and Dll4 mAb on tumor growth in a number of xenograft models. This anti-Dll4 mAb and its corresponding Fab are purified to assess the properties of this antibody (fragment) in biochemical/cellular assays and xenograft models and for specific elutions during phage selections. The published variable heavy and light chain sequences of Dll4 mAb are cloned into a hIgG2aκ framework, transiently expressed in HEK293 cells and purified from supernatants using protein A chromatography. Purified Dll4 mAb shows binding to human Dll4 and mouse Dll4 in ELISA and FACS (using CHO-mDll4 and CHO-hDll4 cells), sub-nanomolar affinities to both growth factor orthologues in Biacore.

The corresponding Dll4 Fab fragment is constructed via gene assembly based on back-translation and codon optimization for expression in E. *coli* using Leto's Gene Optimization software (www.entechelon.com). Oligonucleotide primers for the assembly of the variable light chain (V_L), variable heavy chain (V_H), constant light chain (C_L) and constant domain 1 of the heavy chain (C_{H1}) are designed and an assembly PCR is performed. The cDNA seqments encoding V_L+C_L and V_H+C_{H1} are cloned into a pUC119-derived vector, which

contains the LacZ promotor, a resistance gene for kanamycin, a multiple cloning site and a hybrid gIII-pelB leader sequence, using the restriction sites *SfiI* and *AscI* and the restriction sites *KpnI* and *NotI*, respectively. In frame with the Fab coding sequence, the expression vector encodes a C-terminal HA and His6-tag. The Fab fragment is expressed in E. *coli* as His6-tagged protein and subsequently purified from the culture medium by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC). Relevant amino acid sequences of the variable heavy and variable light chain are depicted (SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2; respectively, of US 2008/0014196); the amino acid sequences of the complete heavy and light chain are shown in SEQ ID NOs: 419 and 420, respectively.

c) Generation of Dll4 mutants for epitope mapping

To identify the region in the extracellular domain (ECD) of Dll4 that comprises the epitope recognized by the anti-Dll4 VHHs, progressive deletion mutants of the Dll4 ECD are generated. The mammalian expression vector pSecTag2/Hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) comprising a CMV promotor upstream of polynucleotides encoding a nested series of deletion fragments of the Dll4 ECD fused to a polyHis-tag are generated using standard recombinant DNA technology (see Figure 2; amino acid domain boundaries in superscript).). These recombinant proteins are expressed in transiently transfected HEK293 cells using the Freestyle 293 Expression System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) from which conditioned medium is collected and purified via IMAC. Only Dll4 mutants lacking the EGF2-like domain showed impaired binding to the humanized human/mouse cross-reactive anti-Dll4 mAb described above (immobilized via a capturing anti-human IgG coated Biacore sensor chip). This IgG is known to have a specific binding epitope in this Dll4 domain (patent application Genentech, US 2008/0014196A1).

d) Generation of Dll4 reporter assay plasmids

A reporter assay is developed based on the γ-secretase mediated cleavage of Notch1 and nuclear translocation of the intracellular domain of Notch1 (NICD) upon stimulation with Dll4, essentially as described (Struhl and Adachi, Cell. 1998 May 15;93(4):649-60). Gal4/VP16 coding sequences are inserted into the NICD-coding sequence. The potent hybrid transcriptional activator GAL4-VP16, which consists of a DNA binding fragment of yeast GAL4 fused to a Herpes simplex viral transcriptional activator domain VP16, is inserted carboxy-terminal to the transmembrane domain of Notch1. Cleavage of this construct by γ-secretase results in the release of the Gal4/VP16 NICD fusion protein which will translocate to the nucleus where it will bind to and transcriptionally activate a co-transfected luciferase reporter plasmid, containing a strong GAL4-UAS promoter sequence (Struhl, G. and Adachi, A., Cell, vol. 93, 649-660, 1998). The human Notch1-Gal4/VP16 expression cassette is cloned in pcDNA3.1(+)-neo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The pGL4.31[Luc2P/Gal4UAS/Hygro] vector (Promega, Madison, WI, USA) is used as luciferase reporter plasmid.

e) Production and functionality-testing of VEGF109

A cDNA encoding the receptor binding domain of human vascular endothelial growth factor isoform VEGF165 (GenBank: AAM03108.1; AA residues 27 - 135) is cloned into pET28a vector (Novagen, Madison, WI) and overexpressed in E.coli (BL21 Star DE3) as a His-tagged insoluble protein. Expression is induced by addition of 1 mM IPTG and allowed to continue for 4 hours at 37°C. Cells are harvested by centrifugation and lysed by sonication of the cell pellet. Inclusion bodies are isolated by centrifugation. After a washing step with 1% Triton X 100 (Sigma-Aldrich), proteins are solubilized using 7.5M guanidine hydrochloride and refolded by consecutive rounds of overnight dialysis using

97

buffers with decreasing urea concentrations from 6M till 0M. The refolded protein is purified by ion exchange chromatography using a MonoQ5/50GL (Amersham BioSciences) column followed by gel filtration with a Superdex75 10/300 GL column (Amersheim BioSciences). The purity and homogeneity of the protein is confirmed by SDS-PAGE and Westen blot. In addition, binding activity to VEGFR1, VEGFR2 and Bevacizumab is monitored by ELISA. To this end, 1 µg/mL of recombinant human VEGF109 is immobilized overnight at 4°C in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1%). Serial dilutions of VEGFR1, VEGFR2 or Bevacizumab are added to the VEGF109 coated plate and binding is detected using alkaline phosphatase (AP) conjugated goat anti-human IgG, Fc specific (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) and a subsequent enzymatic reaction in the presence of the substrate PNPP (p-nitrophenylphosphate) (Sigma-Aldrich). VEGF109 could bind to VEGFR1, VEGFR2 and Bevacizumab, indicating that the produced VEGF109 is active.

f) KLH conjugation of VEGF165 and functionality-testing of KLH-conjugated VEGF165

Recombinant human VEGF165 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is conjugated to mariculture keyhole limpet hemocyanin (mcKLH) using the Imject Immunogen EDC kit with mcKLH (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Efficient conjugation of the polypeptide to mcKLH is confirmed by SDS-PAGE. Functionality of the conjugated protein is checked by ELISA: 2 µg/mL of KLH conjugated VEGF165 is immobilized overnight at 4°C in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1%). Serial dilutions of VEGFR1 or VEGFR2 are added and binding is detected using a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgG, Fc specific (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) and a subsequent

enzymatic reaction in the presence of the substrate TMB (3,3',5,5'-tetramentylbenzidine) (Pierce, Rockford, IL, USA). The KLH conjugated protein could still interact with VEGFR1, VEGFR2 and Bevacizumab, confirming that the relevant epitopes onVEGF165 are still accessible.

Example 1

Immunization with Dll4 from different species induces a humoral immune response in llama

1.1. Immunizations

After approval of the Ethical Committee of the faculty of Veterinary Medicine (University Ghent, Belgium), 4 llamas (designated No. 208, 209, 230, 231) are immunized with 6 intramuscular injections (100 or 50 µg/dose at weekly intervals) of recombinant human Dll4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, US). The Dll4 antigen is formulated in Stimune (Cedi Diagnostics BV, Lelystad, The Netherlands). Three additional llamas (designated No. 127b, 260, 261) are immunized according to standard protocols with 4 subcutaneous injections of alternating human Dll4 and mouse Dll4 overexpressing CHO cells which are established as described above. Cells are re-suspended in D-PBS and kept on ice prior to injection. Furthermore, three additional llamas (designated No. 282, 283, 284) are immunized according to standard protocols with 4 intramuscular injections (100 or 50 µg/dose at biweekly intervals) of alternating recombinant human Dll4 and mouse Dll4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, US). The first injection at day 0 with human Dll4 is formulated in Complete Freund's Adjuvant (Difco, Detroit, MI, USA), while the subsequent injections with human and mouse Dll4 are formulated in Incomplete Freund's Adjuvant (Difco, Detroit, MI, USA).

1.2. Evaluation of induced immune responses in llama

To evaluate the induction of an immune responses in the animals against human Dll4 by ELISA, sera are collected from llamas 208, 209, 230 and 231 at day 0 (pre-immune), day 21 and day 43 (time of peripheral blood lymphocyte [PBL] collection), from llamas 127b, 260 and 261 at day 0 and day 51, and from llamas 282, 283 and 284 at day 0, day 28 and day 50. In short, 2 µg/mL of recombinant human Dll4 or mouse Dll4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) are immobilized overnight at 4°C in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1%). After addition of serum dilutions, specifically bound immunoglobulins are detected using a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-llama immunoglobulin (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) and a subsequent enzymatic reaction in the presence of the substrate TMB (3,3',5,5'-tetramentylbenzidine) (Pierce, Rockford, IL, USA), showing that a significant antibody-dependend immune response against Dll4 is induced. The antibody response is mounted both by conventional and heavy-chain only antibody expressing B-cell repertoires since specifically bound immunoglobulins can be detected with antibodies specifically recognizing the conventional llama IgG1 antibodies or the heavy chain only llama IgG2 or IgG3 antibodies (Table 2-A). In all llamas injected with mouse Dll4, an antibody response is mounted by conventional and heavy chain only antibody expressing B-cells specifically against mouse Dll4. Additionally, serum titers of cell immunized animals are confirmed by FACS analysis on human and mouse Dll4 overexpressing HEK293 cells (Table 2-B). The Dll4 serum titer responses for each llama are depicted in Table 2.

Table 2: Antibody-mediated specific serum response against DLL4

A) ELISA (recombinant protein, coated on solid phase)

		Recombinant human DLL4				Recombinant mouse DLL4			
Llama	**Immunogen**	**Total IgG**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**	**Total IgG**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**
208	rec. human DLL4	+	+	+/-	+/-	n/d	n/d	n/d	n/d
209	rec. human DLL4	+	+	+/-	+/-	n/d	n/d	n/d	n/d
230	rec. human DLL4	++	++	+/-	+/-	n/d	n/d	n/d	n/d
231	rec. human DLL4	++	++	++	++	n/d	n/d	n/d	n/d
127b	CHO-hDLL4 + CHO-mDLL4	++	++	+/-	+/-	+	++	+/-	+/-
260	CHO-hDLL4 + CHO-mDLL4	++	++	+	+	++	++	+	++

261	CHO-hDLL4 + CHO-mDLL4	++	++	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
282	rec. human DLL4 + mouse DLL4	++	++	++	++	++	++	+	+
283	rec. human DLL4 + mouse DLL4	++	++	++	++	++	++	++	++
284	rec. human DLL4 + mouse DLL4	+	+	+	+	+	++	+	++

n/d, not determined

B) FACS (natively expressed protein on HEK293 cells)

		human DLL4				mouse DLL4			
Llama	**Immunogen**	**Total IgG**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**	**Total IgG**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**
208	rec. human DLL4	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
209	rec. human DLL4	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
230	rec. human DLL4	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
231	rec. human DLL4	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
127b	CHO-hDLL4 + CHO-mDLL4	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
260	CHO-hDLL4 + CHO-mDLL4	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
261	CHO-hDLL4 + CHO-	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d

	mDLL4								
282	rec. human DLL4 + mouse DLL4	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
283	rec. human DLL4 + mouse DLL4	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
284	rec. human DLL4 + mouse DLL4	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

n/d, not determined

Example 2

Cloning of the heavy-chain only antibody fragment repertoires and preparation of phage

Following the final immunogen injection, immune tissues as the source of B-cells that produce the heavy-chain antibodies are collected from the immunized llamas. Typically, two 150-ml blood samples, collected 4 and 8 days after the last antigen injection, and one lymph node biopsy, collected 4 days after the last antigen injection are collected per animal. From the blood samples, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are prepared using Ficoll-Hypaque according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). From the PBMCs and the lymph node biopsy, total RNA is extracted, which is used as starting material for RT-PCR to amplify the VHH encoding DNA segments, as described in WO 05/044858. For each immunized llama, a library is constructed by pooling the total RNA isolated from all collected immune tissues of that animal. In short, the PCR amplified VHH repertoire is cloned via specific restriction sites into a vector designed to facilitate phage display of the VHH library. The vector is derived from pUC119 and contains the LacZ promoter, a M13 phage gIII protein coding sequence, a resistance gene for ampicillin or carbenicillin, a multiple cloning site and a hybrid gIII-pelB leader sequence (pAX050). In frame with the VHH coding sequence, the vector encodes a C-terminal c-myc tag and a His6 tag. Phage are prepared according to standard protocols and stored after filter sterilization at 4°C for further use.

Example 3

Selection of Dll4-specific VHHs via phage display

VHH repertoires obtained from all llamas and cloned as phage library are used in different selection strategies, applying a multiplicity of selection conditions. Variables include i) the Dll4 protein format (C-terminally His-tagged recombinantly expressed extracellular domain of human Dll4 (Met1-Pro524) and mouse Dll4 (Met1-Pro525) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), or full length human Dll4 and mouse Dll4 present on Dll4-overexpressing CHO or HEK293 cells, ii) the antigen presentation method (plates directly coated with Dll4 or Neutravidin plates coated with Dll4 via a biotin-tag; solution phase: incubation in solution followed by capturing on Neutravidin-coated plates), iii) the antigen concentration and iv) different elution methods (non-specific via trypsin or specfic via cognate receptor Notch1/Fc chimera or anti-Dll4 IgG/Fab). All selections are done in Maxisorp 96-well plates (Nunc, Wiesbaden, Germany).

Selections are performed as follows: Dll4 antigen preparations for solid and solution phase selection formats are presented as described above at multiple concentrations. After 2h incubation with the phage libraries followed by extensive washing, bound phage are eluted with trypsin (1 mg/mL) for 30 minutes. In case trypsin is used for phage elution, the protease activity is immediately neutralized applying 0.8 mM protease inhibitor ABSF. As control, selections w/o antigen are performed in parallel. Phage outputs that show enrichment over background (non-antigen control) are used to infect *E. coli*. Infected E. *coli* cells are either used to prepare phage for the next selection round (phage rescue) or plated on agar plates (LB+amp+glucose$^{2\%}$) for analysis of individual VHH clones. In order to screen a selection output for specific binders, single colonies are picked from the agar plates and grown in

1 mL 96-deep-well plates. LacZ-controlled VHH expression is induced by adding IPTG (0.1-1mM final) in the absence of glucose. Periplasmic extracts (in a volume of ~ 80 uL) are prepared according to standard protocols

Example 4

Screening of periplasmic extracts in Dll4-Notch1 AlphaScreen and FMAT competition assay

Periplasmic extracts are screened in a human Dll4/human Notch1 AlphaScreen assay to assess the blocking capacity of the expressed VHHs. Human Dll4 is biotinylated using biotin (Sigma, St Louis, MO, USA) and biotinamidohexanoic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt (Sigma, St Louis, MO, USA). Notch1/Fc chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is captured using an anti-Fc VHH which is coupled to acceptor beads according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer, Waltham, MA, US). To evaluate the neutralizing capacity of the VHHs, dilution series of the periplasmic extracts are pre-incubated with biotinylated human Dll4. To this mixture, the acceptor beads and the streptavidin donor beads are added and further incubated for 1 hour at room temperature. Fluorescence is measured by reading plates on the Envision Multilabel Plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) using an excitation wavelength of 680 nm and an emission wavelength of 520 nm. Decrease in fluorescence signal indicates that the binding of biotinylated human Dll4 to the human Notch1/Fc receptor is blocked by the VHH expressed in the periplasmic extract.

Alternatively, CHO-hDll4 and CHO-mDll4 cells are used in a human Notch1/Fc FMAT (Fluorometric Microvolume Assay Technology) competition assay. Recombinant human Notch1/Fc chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is randomly labeled with Alexa-647 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In brief, 5 µL periplasmic material is added to 100 pM or 175 pM labeled human

82

Notch1/Fc together with 7,500 CHO-hDll4 or CHO-mDll4 overexpressing cells, respectively, and readout is performed after 2 hours of incubation. To set the no-competition baseline, at least 30 replicates of cells with human Notch1/Fc~Alexa647 are included and the percentage of inhibition is calculated from this baseline. All calculations are based on the FL1_total signal which comprises the average of the fluorescence per well times the number of counts per well.

From this screening, inhibiting VHHs are selected and sequenced. Sequence analysis revealed 166 unique VHHs belonging to 40 different B-cell lineages. The total number of variants found for each B-cell lineage is depicted in Table 3. An overview of periplasmic screening data is given in Table 4. The amino acid sequences of unique VHHs selected for further characterization are shown in the Sequence Listing (SEQ ID NOs: 4 - 20) and in Table 5 (CDRs and framework regions are indicated).

Table 3: Selection parameters used for the identification of DLL4-specific VHH B-cell lineages

B-cell lineage	VHH ID	# variants	library	selection format	phage elution	selection rounds
1	DLLBII8A09	31	231	rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
2	DLLBII5B11	1	231	rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
3	DLLBII7B05	21	231	RI: biot-rhDLL4 (3 nM) RII: biot-rhDLL4 (0.03 nM)	trypsin	2
4	DLLBII6B11	13	231	biot-rhDLL4 (3 M)	trypsin	1
5	DLLBII8C11	5	231	RI: biot-rhDLL4 (3 nM) RII: biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	2
6	DLLBII19D10	1	231	biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
7	DLLBII33C05	2	231	CHO-hDLL4 (2E6/mL)	trypsin	1
8	DLLBII28B06	2	231	rmDLL4 (0.5 ug/mL)	trypsin	1
9	DLLBII17G10	1	231	biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
10	DLLBII17C01	8	231	biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
11	DLLBII19F04	1	231	biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
12	DLLBII17F10	1	231	biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
13	DLLBII17B03	5	231	biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1
14	DLLBII19F12	2	231	biot-rhDLL4 (3 nM)	trypsin	1

15	DLLBII42B07	1	231	RI: biot-rhDLL4 (3 nM) RII: biot-rhDLL4 (3 nM)	rhNotch1 /Fc	2
16	DLLBII47D01	1	230	RI: biot-rhDLL4 (3 nM) RII: biot-rhDLL4 (3 nM)	rhNotch1 /Fc	2
17	DLLBII56A09	15	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL)	rhNotch1 /Fc	2
18	DLLBII95F02	5	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2
19	DLLBII96C03	20	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2
20	DLLBII104G01	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (+rhDLL4)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
21	DLLBII102F08	3	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (0.01 nM)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
22	DLLBII112A03	1	209	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2
23	DLLBII102G04	2	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (0.01 nM)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
24	DLLBII101G08	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (0.1 nM)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
25	DLLBII112A04	1	209	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2

53

26	DLLBII101H09	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (0.1 nM)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
27	DLLBII101H05	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (1 nM)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
28	DLLBII112E07	1	209	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2
29	DLLBII101F01	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (1 nM)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
30	DLLBII104A03	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (1 nM) + rhDLL4	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
31	DLLBII104C04	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (1 nM) + rhDLL4	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
32	DLLBII104B05	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (1 nM) + rhDLL4	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII)	3
33	DLLBII107C03	1	208	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL)	rhNotch1 /Fc	2
34	DLLBII58A11	4	260	RI: biot-rhDLL4 (3 nM) RII: biot-rmDLL4 (3 nM)	rhNotch1 /Fc	2
35	DLLBII61F05	1	260	RI: HEK293H-hDLL4 (2E6/mL) RII: HEK293H-hDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2
36	DLLBII61F07	1	260	RI: HEK293H-hDLL4 (2E6/mL) RII: HEK293H-hDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2

37	DLLBII62C11	1	260	RI: HEK293H-hDLL4 (2E6/mL) RII: HEK293H-mDLL4 (2E6/mL)	trypsin	2
38	DLLBII115A05	1	230	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RII: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RIII: biot-rhDLL4 (1 nM) RIV:CHO-mDLL4 (2E6/mL)	rhNotch1 /Fc (RI-RII) trypsin (RIII) trypsin (RIV)	4
39	DLLBII83G01	4	284	RI: CHO-mDLL4 (2E6/mL) RI: CHO-hDLL4 (2E6/mL)	DLL4 IgG	2
40	DLLBII80E08	1	283	RI: CHO-hDLL4 (2E6/mL) RI: CHO-hDLL4 (2E6/mL)	DLL4 IgG	2

Table 4:

Screening of periplasmic extracts containing expressed anti-DLL4 VHH

B-cell lineage	Representative VHH ID	# unique sequences	ELISA	Alpha Screen	FMAT	FMAT	Biacore (a)
			hDLL4 % inh	hDLL4 % inh	hDLL4 % inh	mDLL4 % inh	k_d (s^{-1})
1	DLLBII8A09	31	96	-	-	-	(1.2^{E-03}-2.4^{E-04})
2	DLLBII5B11	1	98	-	-	-	-
3	DLLBII7B05	21	84	-	-	-	(2.4^{E-04})
4	DLLBII6B11	13	98	-	-	-	(9.4^{E-04}-3.7^{E-04})
5	DLLBII8C11	5	57	-	-	-	(7.3^{E-04}-6.0^{E-04})
6	DLLBII19D10	1	98	85	-	-	1.3^{E-03}
7	DLLBII33C05	2	86	75	-	-	9.2^{E-04} (2.1^{E-03})
8	DLLBII28B06	2	23	54	-	-	7.5^{E-03} (1.6^{E-04})
9	DLLBII17G10	1	93	82	-	-	1.5^{E-03}
10	DLLBII17C01	8	82	84	-	-	5.6^{E-04} (5.6^{E-04}-5.3^{E-04})
11	DLLBII19F04	1	98	95	-	-	1.1^{E-03}

12	DLLBII17F10	1	98	88	-	-	1.1^{E-03} / $3.1^{E-04\ (b)}$
13	DLLBII17B03	5	76	77	-	-	1.2^{E-03} / $2.2^{E-04\ (b)}$
14	DLLBII19F12	2	98	98	-	-	4.9^{E-04} (1.0^{E-03})
15	DLLBII42B07	1	-	-	-	-	-
16	DLLBII47D01	1	-	-	87	-	-
17	DLLBII56A09	15	-	-	-	-	1.1^{E-03} (9.5^{E-03}-1.1^{E-03})
18	DLLBII95F02	5	-	-	81	71	6.7^{E-04}
19	DLLBII96C03	20	-	-	75	83	-
20	DLLBII104G01	1	-	-	94	86	1.2^{E-03} (1.4^{E-03}-9.4^{E-04})
21	DLLBII102F08	3	-	-	85	75	-
22	DLLBII112A03	1	-	-	72	97	-
23	DLLBII102G04	2	-	-	86	82	-
24	DLLBII101G08	1	-	-	91	92	2.1^{E-03}
25	DLLBII112A04	1	-	-	75	90	-
26	DLLBII101H09	1	-	-	87	75	-
27	DLLBII101H05	1	-	-	85	83	-
28	DLLBII112E07	1	-	-	80	85	-
29	DLLBII101F01	1	-	-	85	78	2.0^{E-02}
30	DLLBII104A03	1	-	-	86	83	-
31	DLLBII104C04	1	-	-	87	83	1.0^{E-03}
32	DLLBII104B05	1	-	-	86	78	-
33	DLLBII107C03	1	-	-	75	80	-
34	DLLBII58A11	4	-	-	95	73	1.6^{E-03} (1.7^{E-03}-1.6^{E-03})
35	DLLBII61F05	1	-	-	74	76	-
36	DLLBII61F07	1	-	-	79	77	-
37	DLLBII62C11	1	-	-	74	71	-
38	DLLBII115A05	1	-	-	74	84	3.1^{E-03}
39	DLLBII83G01	4	-	-	87	93	4.1^{E-04}
40	DLLBII80E08	1	-	-	71	82	-

[a] if multiple unique variants within a B-cell lineage are identified, the range (max-min) in off-rate or the off-rate of a lineage member is given between brackets in italics).

[b] heterogeneous fit: fast and slow off-rate determined.

Table 5: Sequence IDs and AA sequences of selected monovalent anti-DLL4 VHHs (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID/ SEQ ID NO	Framework 1	CDR 1	Framework 2	CDR 2	Framework 3	CDR 3	Framework 4
DLLBII 05B11 4	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAI SGFTLD	LHVIG	WLRQAPGKERE WVS	CISSSD GSTYYA DSVKG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAA	PWDSWY CGIGND YDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 06B1 5	EVQLVESEGGLV QAGGSLRLSCAA SGSTFS	SYAMG	WYRQAPGKQRE LVA	VISNGG ITNYPN SVKG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCFY	SGSYYY PTDVHE YDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 07A02 6	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGSTFN	SYAMG	WYRQAPGKQRE WVA	AFSTGG STNYAD SVKG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCFY	SGSYYY PTDVFE YDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 07B05 7	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGFALD	YYAVG	WFRQAPGKERE GVS	CISSRG GSTFYA DSVKG	RFTTSRNNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAA	HPLQNC CGGSAY ASPEAV YEY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 08A09 8	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTLD	YYNIG	WFRQAPGKERE WVS	CINSSD GSTYYA DSVKG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAA	PFAYYS NLCGVN GYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 08C11 9	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKERE GVS	CISSHD RTTYYA DSVKG	RFTISSDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAA	DPLVCG YNDPRL ADY	WGQGTQVTVSS

DLLBII 101G08 **10**	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGRTFS	SYAMA	WFRQAPGKERE FVA	AIRWSG GTAYYA DSVQG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAN	RAADTR LGPYEY DY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 104G01 **11**	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKERE GVS	CISSSD GSTYYA DSVKG	RFTISSDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAT	AWCDSS WYRSFV GY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 115A05 **12**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFG	SYDMS	WVRRSPGKGPE WVS	SINSGG GSTYYA DFVKG	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLKP EDTAVYYCAA	DRYIRA RQGDYW GAYEYD Y	WGQGTQVTVSS
DLLBII 19F04 **13**	EVQLVESGGGLV QAEGSLRLSCAA SGSTFS	TYAMA	WYRQAPGKQRE LVA	GISFDG STHYAE SVKG	RFTISRDDAKN TVSLQMNSLKP EDAAVYYCYS	VHPSTG FGS	WGQGTQVTVSS
DLLBII 55D12 **14**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPE GIS	CISSSG GITYYA DSVKG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAT	PGIAAC RGIHY	TGQGTQVTVSS
DLLBII 56A09 **15**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPE GIS	CISSSG GITYYA DSVKG	RFTTSRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAT	PGIAAC RGIHY	TGQGTQVTVSS
DLLBII 56C04 **16**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCTA SGFTFD	VYAIG	WFRQAPGKEPE GIS	CISSSG SITYYA DSVKG	RFTTSRDSAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAT	PGIAAC RGIHY	WGQGTQVTVSS
DLLBII5 6H08 **17**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPE EIS	CISSSG GITYYA DSVKG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAT	PGIAAC RGIHY	TGQGTQVTVSS
DLLBII 62C11 **18**	EVQLMESGGGLV QPGGSLRLSCVA AGFTFS	NYYMS	WVRQAPGKGLE WVS	VISPDG SNTYYA DTVKG	RFTISRGNAKN TLFLQMTGLKS EDAAVYYCAR	GSGSWG V	HGQGTQVTVSS

DLLBII 96C03 19	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFG	NYDMS	WVRQAPGKGPE WVS	AINSGG GDTYYA DSVKG	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLKP EDTAVYYCAT	PRGWGP TGPHEY GY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 57C11 20	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCTA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPE GIS	CISSSG SITYDA DSVKG	RFTISRDNAKN TVYLQMNSLKP EDTAVYYCAT	PGIAAC RGIHY	WGQGTQVTVSS

Example 5

Characterization of purified anti-Dll4 VHHs

Inhibitory anti-Dll4 VHHs selected from the screening described in Example 4 are further purified and characterized. Selected VHHs are expressed in *E. coli* TG1 as c-myc, His6-tagged proteins. Expression is induced by addition of 1 mM IPTG and allowed to continue for 4 hours at 37°C. After spinning the cell cultures, periplasmic extracts are prepared by freeze-thawing the pellets. These extracts are used as starting material and VHHs are purified via IMAC and size exclusion chromatography (SEC) resulting in 95% purity as assessed via SDS-PAGE.

5.1. Evaluation of Dll4 blocking VHHs in ELISA

The blocking capacity of the VHHs is evaluated in a human Dll4 – human Notch1/Fc blocking ELISA. In brief, 1 µg/mL of human Notch1/Fc chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is coated in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). A fixed concentration of 15 nM biotinylated human Dll4 is preincubated with a dilution series of the VHH for 1 hour, after which the mixture is incubated on the coated Notch1 receptor for an additional hour. Residual binding of biotinylated human Dll4 is detected using horseradish peroxidase (HRP) conjugated extravidin (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Figure 3). Human Dll4 is biotinylated as described above. The IC_{50} values for VHHs blocking the human Dll4 – human Notch1/Fc interaction are depicted in Table 6.

Table 6: IC_{50} (nM) values for VHHs in hDLL4/hNotch1-Fc competition ELISA

VHH ID	IC_{50} (nM)
6B11	1.5
55D12	12.3
56A09	4.9
56C04	33.9
56H08	6.9
57C11	17.3
62C11	72.0
96C03	38.4
101G08	9.5
104G01	1.1
115A05	9.1
antiDLL4 Fab	0.7

5.2. Evaluation of Dll4-blocking VHHs in AlphaScreen

In brief, 1 nM biotinylated human Dll4 is captured on streptavidin-coated donor beads (20 µg/mL), while 0.4 nM of the receptor human Notch1 (as a Fc fusion protein) is captured on anti-human Fc VHH-coated acceptor beads (20 µg/mL). Both loaded beads are incubated together with a dilution range of the competing VHH (Figure 4). The IC_{50} values for VHHs blocking the human Dll4 – human Notch1/Fc interaction are depicted in Table 7.

Table 7: IC_{50} (nM) values for VHHs in hDLL4/hNotch1 competition AlphaScreen

VHH ID	IC_{50} (nM)
5B11	0.7
6B11	0.3
7A02	0.4
7B05	1.1
8A09	0.4
8C11	0.7 [(a)]
19F04	0.05 [(a)]

57

55D12	2.3
56A09	1.2
56C04	5.4
56H08	1.6
57C11	2.2
62C11	24.1
115A05	5.0
antiDLL4 Fab	0.3

[a] partial inhibitor

5.3. Inhibition by anti-Dll4 VHHs of human Notch1/Fc binding to human or mouse Dll4 expressed on the CHO cells

The blocking capacity of the VHHs is evaluated in a human and mouse Dll4 – human Notch1/Fc competitive FMAT assay (Figure 5) as outlined in Example 4. The IC_{50} values for VHHs blocking the interaction of human Notch1/Fc to human or mouse Dll4 expressed on CHO cells are depicted in Table 8.

Table 8: (Mean) IC_{50} values (nM) of purified VHHs blocking the interaction of human Notch1/Fc to human or mouse DLL4 expressed on CHO cells (FMAT)

	hDLL4	**mDLL4**
VHH ID	**IC_{50} (nM)**	**IC_{50} (nM)**
6B11	8.9	-
8A09	5.5	-
19F04	33.0	-
55D12	39.1	41.0
56A09	10.6	15.0
56C04	28.7	49.6
56H08	22.0	33.7
57C11	53.9	49.5
62C11	172.2	106.3
96C03	160.8	28.8
101G08	24.6	92.1
104G01	2.5	-
115A05	22.0	43.0
antiDLL4 Fab	5.4	2.3

5.4. Evaluation of Dll4-blocking VHHs in reporter assay

To evaluate the potency of the selected VHHs, a reporter assay is set up which is based on the γ-secretase mediated cleavage of Notch1 and release of the intracellular domain of Notch1 (NICD) upon stimulation with Dll4. The Notch1-GAL4/VP16 construct is cotransfected with the pGL4.31[Luc2P/Gal4UAS/Hygro] reporter plasmid in HEK cells resulting in a transient expression of the fusion protein. These transiently transfected cells are stimulated for 24 hours by co-culture with a HEK293-hDll4 stable cell line. Forty-eight hours post-transfection, the readout is performed. The VHHs are preincubated with the HEK293-hDll4 cells 1 hour before the start of the co-culture and are included during the co-culture (Figure 6). The IC_{50} values of the VHHs for blocking the Dll4-mediated cleavage of Notch1 and subsequent translocation of its NICD to the nucleus of the receptor cell are depicted in Table 9.

Table 9: (Mean) IC_{50} values (nM) of purified VHHs in a DLL4/Notch1 reporter assay

VHH ID	IC_{50}
56A09	540
62C11	4663
96C03	5156
101G08	2760
104G01	964
115A05	1740
anti-DLL4 Fab	133

5.5. Epitope binning

In order to determine whether VHHs can bind simultaneously to Dll4 when e.g. a benchmark antibody is bound, epitope binning experiments are carried out (via Surface Plasmon Resonance (SPR) on a Biacore T100 instrument). Anti-Dll4 Fab fragment is irreversibly immobilized on the reference and on the

active flow cell of a CM5 sensor chip. For each sample (cycle), human Dll4 is injected on the active and reference flow cell and reversibly captured by anti-Dll4 Fab. Additional binding of VHHs is evaluated by injection over the immobilized surface. All VHHs and anti-Dll4 Fab are injected at 100 nM with a surface contact time of 120 seconds and a flow rate of 10 uL/minute. Surface is regenerated using 10 mM glycine (pH1.5). Processed curves are evaluated with Biacore T100 Evaluation software. Table 10-A represents the sequential injection/regeneration path of analysed VHHs and controls. VHHs DLLBII56A09 (SEQ ID NO:15), DLLBII96C03 (SEQ ID NO:19), DLLBII101G08 (SEQ ID NO: 10) and DLLBII115A05 (SEQ ID NO: 112) are shown not to additionally bind to human Dll4 captured by Dll4 Fab. Injection of Dll4 Fab also failed to additionally bind human Dll4 indicating that all epitopes are saturated. Therefore, it can be concluded that these VHHs recognize an epitope overlapping with Dll4 Fab for binding human Dll4. Human-only VHHs DLLBII6B11 (SEQ ID NO:5) and DLLBII104G01 (SEQ ID NO:11) show additional binding on Dll4 Fab captured human Dll4, indicating that these VHHs that are specific for human Dll4 recognize a different epitope than the human/mouse cross-reactive VHHs.

Table 10-A: Epitope-binning of anti-DLL4 VHHs – simultaneous binding with DLL4 Fab

Injection step	**Binding/** *Regeneration*	**[sample]**	**Binding level (RU)**
1	hDLL4	100 nM	1727
2	DLL4 Fab	100 nM	no binding
3	59A9	100 nM	no binding
4	6B11	100 nM	405
5	*Glycine pH1.5*	10 mM	90
6	hDLL4	100 nM	1349
7	104G1	100 nM	276
8	*Glycine pH1.5*	10 mM	87
9	hDLL4	100 nM	1336
10	*Glycine pH1.5*	10 mM	70
11	hDLL4	100 nM	1333
12	96C3	100 nM	no binding

13	101G8	100 nM	no binding
14	115A05	100 nM	no binding
15	*Glycine pH1.5*	10 mM	70

5.6. Epitope mapping using Dll4 deletion mutants

Binding of the VHHs to these Dll4 mutants is assessed in Biacore. In brief, VHHs DLLBII101G08 (SEQ ID NO:10) and DLLBII115A5 (SEQ ID NO:12) are coated on a CM4 Sensorchip and 200 nM of each deletion mutant is injected across the chip. Binding is qualitatively assessed. No binding of DLLBII56A09 (SEQ ID NO:15), DLLBII101G08 (SEQ ID NO: 10) and DLLBII115A05 (SEQ ID NO: 12) is observed to human and mouse Dll4 mutants hDll4.1 and mDll4.8, respectively, lacking EGF-like 2 domain (Table 10-B). Indirect evidence using a hDll4/Dll4 IgG competitive ELISA already pointed to this observation. In brief, 1 µg/mL of Dll4 IgG is coated in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). A fixed concentration of 6 nM biotinylated human Dll4 is preincubated with a dilution series of the VHH for 1 hour, after which the mixture is incubated on the coated IgG for an additional hour. Residual binding of biotinylated human Dll4 is detected using horseradish peroxidase conjugated extravidin (Sigma, St. Louis, MO, USA) (data not shown). Human Dll4 is biotinylated as described above. It is known from patent literature that the monoclonal anti-Dll4 IgG (Genentech, US 2008/0014196A1) binds to an epitope within the EGF-like 2 domain of Dll4.

Table 10-B: Epitope mapping of anti-DLL4 VHHs – binding to DLL4 deletion mutants

	DLLBII56A9		DLLBII101G8		DLLBII115A5	
sample	**Binding (RU)**	**kd (1/s)**	**Binding (RU)**	**Kd (1/s)**	**Binding (RU)**	**kd (1/s)**
hDLL4	281	9.5E-04	373	2.0E-03	324	3.5E-03
mDLL4	389	1.9E-03	502	6.0E-03	344	6.5E-03
hDLL4.1	no binding		no binding		no binding	
hDLL4.3	125	7.4E-04	198	4.65E-03	137	3.5E-03
hDLL4.5	143	1.2E-03	266	2.19E-03	162	4.2E-03
hDLL4.6	136	1.1E-03	229	2.20E-03	152	4.1E-03
mDLL4.8	no binding		no binding		no binding	
mDLL4.10	141	1.1E-03	189	5.14E-03	121	3.8E-03
mDLL4.11	132	1.6E-03	210	6.16E-03	121	6.6E-03
mDLL4.12	161	1.3E-03	244	4.52E-03	152	3.1E-03

5.7. Determining the affinity of the hDll4 – VHH interaction

Kinetic analysis to determine the affinity of the Dll4 – VHH interaction is performed by Surface Plasmon Resonance (SPR) on a Biacore T100 instrument. Recombinant human Dll4 is immobilized onto a CM5 chip via amine coupling using EDC and NHS) or biotinylated human Dll4 is captured on a SA chip (streptavidin surface). Purified VHHs or Fab fragment are injected for 2 minutes at different concentrations (between 10 and 300 nM) and allowed to dissociate for 20 min at a flow rate of 45 µl/min. Between sample injections, the surfaces are regenerated with 10 mM glycine pH1.5 and 100 mM HCl. HBS-N (Hepes buffer pH7.4) is used as running buffer. If possible, data are evaluated by fitting a 1:1 interaction model (Langmuir binding) onto the binding curves. The affinity constant K_D is calculated from resulting association and dissociation rate constants (k_a) and (k_d). The affinities of the anti-Dll4 VHHs are depicted in Table 11.

Table 11: Affinity K_D (nM) of purified VHHs for recombinant human DLL4

	rhDLL4		
VHH ID	**k_a ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**
56A09	1.7E+05	9.3E-04	5.6
56C04	1.1E+05	4.9E-03	45
56H08	1.2E+05	1.1E-03	9.4
62C11	1.2E+06	1.3E-01	120
96C03	1.6E+05	4.8E-02	310
101G08	4.3E+04	2.2E-03	52
104G01 [(a)]	1.2E+05 - 1.5E+05	3E-03 – 6E-04	4-24
115A05	1.5E+05	3.9E-03	25
antiDLL4 Fab	2.3E+05	3.4E-04	1.5

[(a)] heterogeneous binding curve resulting in no 1:1 fit

5.8. Binding to orthologues (mDll4, cDll4) and family members (hJagged-1, hDLL1)

In order to determine cross-reactivity to mouse Dll4 a binding ELISA is performed. In brief, recombinant mouse Dll4 (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) is coated overnight at 4°C at 1 µg/mL in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1% in PBS). VHHs are applied as dilution series and binding is detected using a mouse anti-myc (Roche) and an anti-mouse-AP conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA) (Figure 7). As reference, binding to human Dll4 is measured. EC_{50} values are summarized in Table 12.

66

Table 12: EC_{50} (nM) values for VHHs in a recombinant human DLL4- and mouse DLL4- binding ELISA

	rhDLL4	rmDLL4
VHH ID	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)
5B11	1.8	-
6B11	1.4	-
7A02	1.4	-
7B05	7.2	-
8A09	0.9	-
8C11	1.1	-
17F10	0.9	-
19F04	0.9	0.8
55D12	13.1	30.0
56A09	3.6	6.3
56C04	44.3	244.0
56H08	4.1	8.7
57C11	7.9	83.4
62C11	137.0	13.1
96C03	86.5	8.7
101G08	8.9	53.9
104G01	8.4	-
115A05	5.0	33.4
antiDLL4 Fab	3.0	3.0

In order to determine the cynomologus cross-reactivity of the VHHs, a FACS binding experiment is performed. Cynomolgus Dll4 expressing HEK293 cells (transient or stable transfection) are used for a titration binding experiment of the VHHs. After a 30 minutes incubation on ice, all samples are washed and detection is performed by applying anti-c-myc~Alexa647 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Human and mouse Dll4 overexpressing HEK293 cells are taken as reference. The mean MCF value is determined on the FACS Array and used for calculation of the EC_{50} value (see Figure 9).

Absence of binding to homologous ligands human DLL1 and human Jagged-1 is assessed via solid phase binding assay (ELISA). In brief, human DLL1 (Alexis, San Diego, CA, USA) and human Jagged-1 (Alexis, San Diego, CA,

USA) are coated overnight at 4°C at 1 µg/mL in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1% in PBS). VHHs are applied as dilution series and binding is detected using a mouse anti-myc (Roche) and an anti-mouse-AP conjugate (Sigma, St. Louis, MO, USA). All anti-Dll4 VHHs are considered as being non-cross reactive to these homologous ligands (Figure 8).

5.9. Evaluation of anti-Dll4 VHHs in blocking Dll4-mediated HUVEC proliferation

The potency of the selected VHHs is evaluated in a proliferation assay, as described by Ridgway *et al.*, Nature. 2006 Dec 21; 444(7122):1083-7), in modified form. In brief, 96-well tissue culture plates are coated with purified Dll4-His (RnD Systems; C-terminal His-tagged human Dll4, amino acid 27-524, 0.75ml/well, 10 ng/ml) in coating buffer (PBS, 0.1% BSA). Wells are washed in PBS before 4000 HUVEC cells/well are seeded in quadruplicate. Cell proliferation is measured by [^{3}H]-Thymidine incorporation on day 4. The results, shown in Figure 15, demonstrate that the DLL4 VHHs DLLBII101G08, DLLBII104G01, DLLBII115A05, DLLBII56A09 and the DLL4 Fab inhibit the DLL4-dependent effect on HUVEC proliferation in a dose-dependent manner, the IC_{50} values are summarized in Table 13. The tested VHHs achieve complete inhibition of the DLL4-dependent effect at 10µM.

Table 13: IC_{50} values obtained in the DLL4 proliferation assay

VHH/ Fab	**Fab**	**56A9**	**104G1**	**101G8**	**115A5**
IC_{50} (nM) (experiment 1)	4.9	11.0	103	401	10002
IC_{50} (nM) (experiment 2)	5.6	6.8	32	112	N.D.
n	2	2	2	2	1

61

Example 6

Affinity maturation of selected anti-Dll4 VHHs

VHHs DLLBII101G08 and DLLBII115A05 are subjected to two cycles of affinity maturation.

In a first cycle, amino acid substitutions are introduced randomly in both framework (FW) and complementary determining regions (CDR) using the error-prone PCR method. Mutagenesis is performed in a two-round PCR-based approach (Genemorph II Random Mutagenesis kit obtained from Stratagene, La Jolla, CA, USA) using 1 ng of the DLLBII101G08 or DLLBII115A05 cDNA template, followed by a second error-prone PCR using 0.1 ng of product of round 1. After a polish step, PCR products are inserted via unique restriction sites into a vector designed to facilitate phage display of the VHH library. Consecutive rounds of in-solution selections are performed using decreasing concentrations of biotinylated recombinant human DLL4 (biot-rhDLL4) and trypsin elutions. Affinity-driven selections in a third round using cold rhDLL4 (at least 100x excess over biot-rhDLL4) are also performed. No selections on murine DLL4 are included as (conservation of) cross-reactivity is assessed at the screening level. Individual mutants are produced as recombinant protein using an expression vector derived from pUC119, which contains the LacZ promoter, a resistance gene for ampicillin, a multiple cloning site and an ompA leader sequence (pAX50). *E. coli* TG1 cells are transformed with the expression vector library and plated on agar plates (LB + Amp + 2% glucose). Single colonies are picked from the agar plates and grown in 1 mL 96-deep-well plates. VHH expression is induced by adding IPTG (1mM). Periplasmic extracts (in a volume of ~ 80 uL) are prepared according to standard methods and screened for binding to recombinant human and mouse

Dll4 in a ProteOn (BioRad, Hercules, CA, USA) off-rate assay. In brief, a GLC ProteOn Sensor chip is coated with recombinant human Dll4 on the "ligand channels" L2 and L4 (with L1/L3 as reference channel), while "ligand channels" L3 and L6 is coated with mouse Dll4. Periplasmic extract of affinity-matured clones is diluted 1/10 and injected across the "analyte channels" A1-A6. An average off-rate is calculated of the wild type clones present in the plate and served as a reference to calculate off-rate improvements.

In a second cycle, a combinatorial library is created by simultaneously randomising the susceptible positions identified in cycle one. For this, the full length DLLBII101G8 or DLLBII115A05 cDNA is synthesized by overlap PCR using oligonucleotides degenerated (NNS) at the randomisation positions and a rescue PCR is performed. The randomised VHH genes are inserted into a phage display vector (pAX50) using specific restriction sites as described above (Example 2). Preparation of periplasmic extracts of individual VHH clones is performed as described before.

Screening for binding to recombinant human Dll4 in a ProteOn off-rate assay identifies clones with up to 38-fold (DLLBII101G08) and 11-fold (DLLBII115A05) improved off-rates (Table 15).

Table 15: Off-rate screening of DLLBII101G08 and DLLBII115A05 affinity-matured clones.

	hDLL4 k_d (s^{-1})	fold	mDLL4 k_d (s^{-1})	fold
DLLBII101G08	*2.2E-03*	*1*	*6.7E-03*	*1*
DLLBII129D08	5.9E-05	38	1.9E-04	35
DLLBII129H04	6.8E-05	33	2.5E-04	27
DLLBII129G10	7.3E-05	31	2.6E-04	26
DLLBII129H07	7.4E-05	30	2.5E-04	27
DLLBII129B02	7.6E-05	30	2.6E-04	26
DLLBII129E11	8.0E-05	28	2.5E-04	26
DLLBII130F06	6.5E-05	27	2.6E-04	19
DLLBII130B03	6.7E-05	27	2.4E-04	20
DLLBII129D01	8.5E-05	26	2.6E-04	26

62

DLLBII130D06	6.9E-05	26	3.1E-04	16
DLLBII129G09	8.8E-05	26	3.4E-04	20
DLLBII129B05	9.3E-05	24	3.4E-04	20
DLLBII130E03	7.5E-05	24	2.7E-04	18
DLLBII129H05	9.4E-05	24	3.5E-04	19
DLLBII130A05	7.5E-05	24	3.0E-04	17
DLLBII130B02	7.8E-05	23	2.9E-04	17
DLLBII129H02	9.9E-05	23	3.4E-04	19
DLLBII130B04	8.3E-05	22	2.9E-04	17
DLLBII129E07	1.1E-04	21	2.8E-04	24
DLLBII129E03	1.1E-04	20	3.6E-04	18
DLLBII129A03	1.2E-04	19	3.8E-04	18

The best variants of DLLBII101G08 and DLLBII115A05 variants are cloned into expression vector pAX100 in frame with a C-terminal c-myc tag and a (His)6 tag. Off-rates on recombinant mouse Dll4 are also improved. VHHs are produced in *E. coli* as His6-tagged proteins and purified by IMAC and SEC. Sequences of VHHs selected for further characterization are represented in Tables 16 (DLLBII101G08) and 17 (DLLBII115A05), respectively.

Table 16: Affinity-matured variants of 101G08

VHH ID SEQ ID NO	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DLLBII 129A03 **21**	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGRTFS	SYAMA	WFRQAP GKEREY VA	AIRWSGGTAY YADSVQG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYC AN	RAPDTRLRP YLYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129B05 **22**	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGRTFS	SYAMA	WYRQAP GKEREY VA	AIRWSGGTAY YADSVQG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYC AN	RAPDTRLAP YEYDH	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129D08 **23**	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGRTFS	SYAMA	WYRQAP GKEREY VA	AIRWSGGTAY YADSVQG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYC AN	RAPDTRLEP YLYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129E11 **24**	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGRTFS	SYAMA	WYRQAP GKEREY VA	AIRWSGGTAY YADSVQG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYC AN	RAPDTRLRP YLYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129H07 **25**	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGRTFS	SYAMA	WYRQAP GKEREY VA	AIRWSGGTAY YADSVQG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYC AN	RAPDTRLEP YEYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 130B03 **26**	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGRTFS	SYAMA	WYRQAP GKEREY VA	AIRWSGGTAY YADSVQG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYC AN	RAPDTRLAP YLYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 130F06 **27**	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGRTFS	SYAMA	WYRQAP GKEREY VA	AIRWSGGTAY YADSVQG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYC AN	RAPDTRLAP YEYDY	WGQGTQVTVS S

63

Table 17: Affinity-matured variants of 115A05

VHH ID **SEQ ID NO**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBI I133A 05 **28**	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFG	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGST FYTDYVKG	RFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVY YCAA	DRYIWARQGEY WGAYQYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBI I133A 09 **29**	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFG	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGST YYADYVKG	RFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVY YCAA	DRYIWARQGEY WGAYAYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBI I133G 05 **30**	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFG	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGST YYTDYVKG	RFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVY YCAA	DRYIWARQGEY WGAYAYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBI I134D 10 **31**	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTIG	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	SINSGGGST YYTDYVKG	RFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVY YCAA	DRYIWARQGEY WGAYAYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBI I136C 07 **32**	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFG	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	SINSGGGST YYADYVKG	RFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVY YCAA	DRYIWARQGEY WGAYEYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBI I015 **33**	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTIG	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGST YYADYVKG	RFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVY YCAA	DRYIWARQGEY WGAYAYDY	WGQGTQVTVSS

Example 7

Characterization of affinity-matured purified anti-Dll4 VHHs

Affinity-matured variants of VHHs DLLBII101G08 and DLLBII115A05 are expressed and purified as described above (Example 5). VHHs are characterized in the hDll4 - hNotch1 competition ELISA (Example 5.1; Table 17; Figure10), the CHO-hDll4/hNotch1-Fc and CHO-mDll4/hNotch1-Fc competition FMAT (Example 5.3; Table 18; Figure 11), the hDLL1 and hJAG1 binding ELISA and hDll4/ mDll4/ cynoDll4 FACS (Example 5.8; Table 19; Figures 13 and 14, Table 20 ~~and 15~~), determination of binding affinity on hDLL4 and mDLL4 in Biacore (Example 5.7; Table 19, Figure 12) and the DLL4-mediated reporter assay (Example 5.4; Table 21; Figure 16).

Characterization data are summarized in Table 22. Overall, the affinity-matured VHHs show clear improvements in affinity and potency, while their binding to mDll4 and cyno Dll4 is maintained and no binding to hDLL1 or hJAG1 is observed.

Table 17: IC_{50} (nM) values for affinity-matured VHHs in hDLL4/hNotch1-Fc competition ELISA

VHH ID	IC_{50} (nM)
101G08	*10.0*
129A03	1.8
129B05	0.9
129D08	1.2
129E11	1.3
129H07	1.0
130B03	1.5
130F06	1.3
anti-DLL4 Fab	1.5

VHH ID	IC_{50} (nM)
115A05	*7.5*
133A05	2.1
133A09	1.5
133G05	2.0
134D10	1.3
136C07	1.4
015	0.9
anti-DLL4 Fab	1.2

Table 18: IC_{50} values (nM) of purified affinity-matured VHHs blocking the interaction of human Notch1/Fc to human or mouse DLL4 expressed on CHO cells (FMAT)

	hDLL4	mDLL4
VHH ID	**IC_{50} (nM)**	**IC_{50} (nM)**
101G08 (wt)	*69.3*	*140.5*
129B05	7.4	14.4
129D08	7.8	11.0
129E11	8.1	12.3
DLL4 Fab	5.5	3.0

	hDLL4	mDLL4
VHH ID	**IC_{50} (nM)**	**IC_{50} (nM)**
115A05 (wt)	*106.7*	*348.9*
133A09	6.6	18.6
133G05	5.9	12.0
136C07	8.0	31.2
015	5.7	21.2
DLL4 Fab	3.4	1.6

Table 19: Affinity K_D (nM) of purified affinity-matured VHHs on recombinant human DLL4 and mouse DLL4

	rhDLL4			rmDLL4		
VHH ID	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**
101G08 (wt)	*4.8E+04*	*2.3E-03*	*48.0*	*9.4E+04*	*5.6E-03*	*60.0*
129A03	2.1E+05	1.2E-04	0.5			
129B05	2.3E+05	7.9E-05	0.3	2.7E+05	3.1E-04	1.1
129D08	1.8E+05	6.4E-05	0.4	2.7E+05	2.0E-04	0.8
129E11	1.9E+05	9.0E-05	0.5	2.5E+05	2.9E-04	1.2
129H07	1.6E+05	7.3E-05	0.5			
130B03	2.2E+05	6.8E-05	0.3			
130F06	2.0E+05	8.0E-05	0.4			
anti-DLL4 Fab	2.3E+05	3.4E-04	1.5			

	rhDLL4			rmDLL4		
VHH ID	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**
115A05 (wt)	*2.5E+05*	*4.0E-03*	*16.0*	*1.7E+05*	*9.1E-03*	*53.0*
133A09	4.4E+05	9.0E-04	2.1	3.5E+05	2.7E-03	7.8
133G05	5.9E+05	4.7E-04	0.8	4.7E+05	1.6E-03	3.4
136C07	6.2E+05	3.9E-04	0.6	5.0E+05	1.3E-03	2.6
015	4.5E+05	4.7E-04	1.0	3.5E+05	1.5E-03	4.3
anti-DLL4 Fab	2.3E+05	3.4E-04	1.5			

Table 20: EC_{50} (nM) values of affinity-matured VHHs for binding on CHO-hDLL4, CHO-mDLL4 and CHO-cDLL4 (FACS)

	hDLL4	mDLL4	cDLL4
VHH ID	**EC_{50} (nM)**	**EC_{50} (nM)**	**EC_{50} (nM)**
101G08(wt)	*17.5*		*11.2*
129B05	9.7	3.9	3.9
129D08	9.6	3.7	3.8
129E11	1.4	4.1	4.2
anti-DLL4 Fab	5.6	2.1	2.5

	hDLL4	**mDLL4**	**cDLL4**
VHH ID	**EC_{50} (nM)**	**EC_{50} (nM)**	**EC_{50} (nM)**
115A05(wt)	*11.3*		*13.8*
133A09	7.2	1.7	2.3
133G05	8.5	2.8	2.7
136C07	10.9	8.3	3.5
015	14.8	7.0	5.1
anti-DLL4 Fab	5.6	2.1	2.5

Table 21: IC_{50} (nM) values of affinity-matured VHHs in DLL4-mediated reporter assay

VHH ID	IC_{50} (nM)
101G08 (wt)	*1940*
129B05	60
129D08	77
129E11	98
DLL4 Fab	16

VHH ID	IC_{50} (nM)
115A05 (wt)	*1340*
133A09	87
133G05	104
133H05	25
133H07	35
134D10	18
136C07	226
015	18
DLL4 Fab	16

Table 22: Characteristics of affinity-matured VHHs derived from DLLBII101G08 and DLLBII115A05

			ELISA	FMAT hDLL4	FMAT mDLL4	FACS	FACS	FACS	ELISA	ELISA
	K_D (nM) hDLL4	K_D (nM) mDLL4	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	hDLL1	hJag-1
101G08	*48.0*	*60.0*	*10.0*	*69.3*	*140.5*	*17.5*	*NF*	*11.2*	*nb*	*nb*
129A03	0.5		1.8							
129B05	0.3	1.1	0.9	7.4	14.4	9.7	3.9	3.9	nb	nb
129D08	0.4	0.8	1.2	7.8	11.0	9.6	3.7	3.8	nb	nb
129E11	0.5	1.2	1.3	8.1	12.3	10.4	4.1	4.2	nb	nb
129H07	0.5		1.0							
130B03	0.3		1.5							
130F06	0.4		1.3							
DLL4 Fab	1.5		1.5	5.5	3.0	5.6	2.1	2.5		

66

			ELISA	FMAT hDLL4	FMAT mDLL4	FACS	FACS	FACS	ELISA	ELISA
	K_D (nM) hDLL4	K_D (nM) mDLL4	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	hDLL1	hJag-1
115A05	*16.0*	*53.0*	*7.5*	*106.7*	*348.9*	*11.3*	*NF*	*13.8*	*nb*	*nb*
133A05			2.1							
133A09	2.1	7.8	1.5	6.6	18.6	7.2	1.7	2.3	nb	nb
133G05	0.8	3.4	2.0	5.9	12.0	8.5	2.8	2.7	nb	nb
134D10			1.3							
136C07	0.6	2.6	1.4	8.0	31.2	10.9	8.3	3.5	nb	nb
015	1.0	4.3	0.9	5.7	21.2	14.8	7.0	5.1	nb	nb
DLL4 Fab	1.5		1.2	3.4	1.6	5.6	2.1	2.5		

nb: no binding

Example 8

Sequence optimization of VHH DLLBII129B05 and DLLBII136C07

The amino acid sequence of DLLBII129B05 (Figure 17-A) and DLLBII136C07 (Figure 17-B) is aligned to the human germline VH3/JH consensus sequence. Residues are numbered according to Kabat, CDRs are shown in grey according to AbM definition (Oxford Molecular's AbM antibody modelling software).

Residues to be mutated to their human counterpart are underlined.

The alignment shows that DLLBII129B05 contains 4 framework mutations relative to the reference germline sequence. Non-human residues at positions

14, 64, 83 and 108 are selected for substitution with their human germline counterparts. A set of 2 DLLBII129B05 variants (DLLBII017 and DLLBII018) carrying different combinations of human residues on these positions is constructed and produced (Example 6; AA sequences are listed in Table 23).

For DLLBII136C07, the VHH contains 4 framework mutations relative to the reference germline sequence. Non-human residues at positions 39, 40, 83 and 108 are selected for substitution with their human germline counterparts. A set of 4 DLLBII136C07 variants (DLLBII019, DLLBII020, DLLBII021, DLLBII022) is generated carrying different combinations of human residues at these positions (Example 6; AA sequences are listed in Table 24). In parallel, a potential Asn deamidation site at position N52-S52a (CDR2 region, see Figure 17-B boxed residues) is removed by introducing a N52S mutation. In a second cycle, tolerated mutations from the humanization effort and the N52S substitution are combined, resulting in sequence-optimized variant DLLBII036. One additional sequence-optimized variant (DLLBII039) is constructed including a F29I mutation in CDR1, which is shown to increase the potency of DLLBII136C07 in the DLL4-mediated reporter assay (Table 21; Figure 16). Sequences of both sequence-optimized variants of DLLBII136C07 are listed in Table 25.

All these variants are characterized as purified protein in the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc competitive FMAT assay (example 5.3; Table 26; Figure 18), the DLL4 mediated reporter assay (example 5.4; Table 27; Figure 19), the DLL4 HUVEC proliferation assay (example 5.9; Table 28) and in Biacore for affinity determination (example 5.7; Table 29). Additionally, the melting temperature (T_m) of each clone is determined in a thermal shift assay, which is based on the increase in fluorescence signal upon incorporation of Sypro Orange (Invitrogen) (Ericsson et al, Anal. Biochem. 357 (2006), pp289-298). All variants displayed similar T_m

67

values when compared to the parental DLLBII129B05. Table 30 summarizes T_m values at pH 7 for these clones.

Table 23: Sequence IDs and AA sequences of monovalent sequence-optimized anti-DLL4 VHHs of parental DLLBII129B05 (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID **SEQ ID NO**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII 017 **34**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYAM A	WYRQ APGK EREY VA	AIRWS GGTAY YADSV QG	RFTIS RDNAK NTVYL QMNSL RPEDT AVYYC AN	RAPDTRLA PYEYDH	WGQGT LVTVS S
DLLBII 018 **35**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYAM A	WYRQ APGK EREY VA	AIRWS GGTAY YADSV KG	RFTIS RDNAK NTVYL QMNSL RPEDT AVYYC AN	RAPDTRLA PYEYDH	WGQGT LVTVS S

Table 24: Sequence IDs and AA sequences of monovalent sequence-optimized anti-DLL4 VHHs of parental DLLBII136C07 (cycle 1) (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID **SEQ ID NO**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII 019 **36**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GFTFG	SYDMS	WVRRS PGKGP EWVS	SINSG GGSTY YADYV KG	RFTIS RDNAK NTLYL QMNSL RPEDT AVYYC AA	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTLV T VSS
DLLBII 020 **37**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GFTFG	SYDMS	WVRQS PGKGP EWVS	SINSG GGSTY YADYV KG	RFTIS RDNAK NTLYL QMNSL RPEDT AVYYC AA	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTLV TVSS
DLLBII 021 **38**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GFTFG	SYDMS	WVRRA PGKGP EWVS	SINSG GGSTY YADYV KG	RFTIS RDNAK NTLYL QMNSL RPEDT AVYYC AA	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTLV TVSS
DLLBII 022 **39**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GFTFG	SYDMS	WVRQA PGKGP EWVS	SINSG GGSTY YADYV KG	RFTIS RDNAK NTLYL QMNSL RPEDT AVYYC AA	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTLV TVSS

GB

Table 25: Sequence IDs and AA sequences monovalent sequence-optimized anti-DLL4 VHHs of parental DLLBII136C07 (cycle 2) (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID **SEQ ID NO**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII 036 **40**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GFTFG	SYDMS	WVRRA PGKGP EWVS	SISSG GGSTY YADYV KG	RFTIS RDNAK NTLYL QMNSL RPEDT AVYYC AA	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQG TLVT VSS
DLLBII 039 **41**	EVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GFTIG	SYDMS	WVRRA PGKGP EWVS	SISSG GGSTY YADYV KG	RFTIS RDNAK NTLYL QMNSL RPEDT AVYYC AA	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQG TLVT VSS

Table 26: IC_{50} (nM) values of sequence-optimized VHHs CHO-hDLL4 and CHIO-mDLL4 competition FMAT

	hDLL4	mDLL4
VHH ID	**IC_{50} (nM)**	**IC_{50} (nM)**
129B05	8.2	15.9
017	12.1	n/d
018	11.0	15.4
DLL4 Fab	5.8	4.3

n/d, not determined

	hDLL4	mDLL4
VHH ID	**IC_{50} (nM)**	**IC_{50} (nM)**
136C07	11.4	50.8
019	3.0	n/d
020	44.6	n/d
021	2.1	n/d
022	95.4	n/d
036	9.7	44.7
039	6.2	43.8
DLL4 Fab	5.4	4.3

n/d, not determined

Table 27: IC_{50} (nM) values of sequence-optimized VHHs in DLL4-mediated reporter assay

	hDLL4
VHH ID	**IC_{50} (nM)**
129B05	108
017	126
018	136
DLL4 Fab	23

	hDLL4
VHH ID	**IC_{50} (nM)**
136C07	112
019	n/d
020	n/d
021	n/d
022	n/d
036	78
039	16
DLL4 Fab	24

n/d, not determined

Table 28: IC_{50} (nM) values of sequence-optimized VHHs in DLL4-mediated HUVEC proliferation assay

VHH ID	**IC_{50} (nM)**	Inhibition (%)
129B05	3.7	**100**
018	5.3	100
DLL4 Fab	4.7	100

VHH ID	**IC_{50} (nM)**	**Inhibition (%)**
136C07	14.5	**100**
036	7.6	100
039	14.4	100
DLL4 Fab	4.7	100

Table 29: Affinity of sequence-optimized VHHs (Biacore) (for reference, DLL4 Fab has an affinity of 1.5 nM)

VHH ID	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
129B05	3.4E+05	7.9E-05	0.2
017	3.7E+05	8.0E-05	0.2
018	4.5E+05	9.4E-05	0.2

VHH ID	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
136C07	5.5E+05	5.2E-04	1.0
019	5.7E+05	7.4E-04	1.3
020	3.4E+05	9.3E-03	27
021	5.6E+05	5.7E-04	1.0
022	4.7E+05	2.2E-02	46
036	6.6E+05	5.5E-04	0.8
039	4.5E+05	8.1E-04	1.8

Table30: T_m values (°C) at pH7 of sequence-optimized VHHs

VHH ID	Tm (°C)
129B05	67.3
017	68.1
018	71.0

VHH ID	Tm (°C)
136C07	68.1
019	69.0
020	69.0
021	69.0
022	70.3
036	71.4
039	69.4

Example 9

Immunization with different VEGF formats induces a humoral immune response in llama

9.1 Immunizations

After approval of the Ethical Committee of the faculty of Veterinary Medicine (University Ghent, Belgium), 4 llamas (designated No. 264, 265, 266, 267) are immunized according to standard protocols with 6 intramuscular injections (100 or 50 µg/dose at weekly intervals) of recombinant human VEGF109. The first injection at day 0 is formulated in Complete Freund's Adjuvant (Difco, Detroit, MI, USA), while the subsequent injections are formulated in Incomplete Freund's Adjuvant (Difco, Detroit, MI, USA). In addition, four llamas (designated No. 234, 235, 280 and 281) are immunized according to the following protocol: 5 intramuscular injections with KLH-conjugated human VEGH165 (100 or 50 µg/dose at biweekly intervals) followed by 4 intramuscular injections of human VEGF109 (first dose of 100 µg, followed 2 weeks later with three 50 µg/dose at weekly interval).

9.2 Evaluation of VEGF-induced immune responses in llama

To monitor VEGF specific serum titers, an ELISA assay is set up in which 2 µg/mL of recombinant human VEGF165 or VEGF109 is immobilized overnight at 4°C in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1%). After addition of serum dilutions, bound total IgG is detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-llama immunoglobulin (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) and a subsequent enzymatic reaction in the presence of the substrate TMB (3,3',5,5'-tetramentylbenzidine) (Pierce, Rockford, IL, USA). For llamas 264, 265, 266 and 267 an additional ELISA is performed in which the isotype

70

specific responses against VEGF165 and VEGF109 are evaluated. Isotype specific responses are detected using mouse mAbs specifically recognizing conventional llama IgG1 and the heavy-chain only llama IgG2 and IgG3 [Daley et al. (2005). Clin. Diagn. Lab. Imm. 12:380-386] followed by a rabbit anti-mouse-HRP conjugate (DAKO). ELISAs are developed using TMB as chromogenic substrate and absorbance is measured at 450nm. The serum titers for each llama are depicted in Table 31.

Table 31: Antibody-mediated specific serum response against VEGF165 and VEGF109. ELISA (solid phase coated with recombinant protein)

		Recombinant human VEGF165				Recombinant human VEGF109			
Llama	Immunogen	Total IgG	IgG 1	IgG 2	Ig G3	Total IgG	IgG1	IgG2	IgG3
234	VEGF165-KLH + VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
235	VEGF165-KLH + VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
280	VEGF165-KLH + VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
281	VEGF165-KLH + VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
264	VEGF109	n/d	++	+	+	++	++	+	+
265	VEGF109	n/d	++	+	+	+	++	+	+
266	VEGF109	n/d	++	+	+/-	++	++	+	+/-
267	VEGF109	n/d	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-

n/d, not determined

Example 10

Selection of VEGF-specific VHHs via phage display

The cloning of the heavy-chain only antibody fragment repertoires and preparation of phage is performed as described in Example 2. VHH phage libraries are used in different selection strategies applying a multiplicity of selection conditions. Variables include i) the VEGF protein format (rhVEGF165, rhVEGF109 or rmVEGF164), ii) the antigen presentation method (solid phase: directly coated or via a biotin-tag onto Neutravidin-coated plates; solution phase: incubation in solution followed by capturing on Neutravidin-coated plates), iii) the antigen concentration and iv) the elution method (trypsin or competitive elution using VEGFR2). All selections are carried out in Maxisorp 96-well plates (Nunc, Wiesbaden, Germany).

Selections are performed as follows: Phage libraries are incubated at RT with variable concentrations of VEGF antigen, either in solution or immobilized on a solid support. After 2hrs of incubation and extensive washing, bound phage are eluted. In case trypsin is used for phage elution, the protease activity is immediately neutralized by addition of 0.8 mM protease inhibitor AEBSF. Phage outputs that show enrichment over background are used to infect *E. coli*. Infected E. *coli* cells are either used to prepare phage for the next selection round (phage rescue) or plated on agar plates (LB+amp+glucose$^{2\%}$) for analysis of individual VHH clones. In order to screen a selection output for specific binders, single colonies are picked from the agar plates and grown in 1 mL 96-deep-well plates. The lacZ-controlled VHH expression is induced by adding IPTG (0.1-1mM final). Periplasmic extracts (in a volume of ~ 80 uL) are prepared according to standard methods.

71

Example 11

Identification of VEGF-binding (non-receptor blocking) and VEGF-blocking (receptor-blocking) VHHs

Periplasmic extracts are tested for binding to human VEGF165 by ELISA. In brief, 2 µg/mL of recombinant human VEGF165 is immobilized overnight at 4°C in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1%). After addition of typically a 10-fold dilution of the periplasmic extracts, VHH binding is detected using a mouse anti-myc (Roche) and an anti-mouse-HRP conjugate (DAKO). Clones showing ELISA signals of >3-fold above background are considered as VEGF binding VHHs.

In addition, periplasmic extracts are screened in a human VEGF165/human VEGFR2 AlphaScreen assay to assess the blocking capacity of the VHHs. Human VEGF165 is biotinylated using Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA). Human VEGFR2/Fc chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is captured using an anti-humanFc VHH which is coupled to acceptor beads according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer, Waltham, MA, US). To evaluate the neutralizing capacity of the VHHs, periplasmic extracts are diluted 1/25 in PBS buffer containing 0.03 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) and preincubated with 0.4 nM biotinylated human VEGF165 for 15 minutes at room temperature (RT). To this mixture the acceptor beads (10µg/ml) and 0.4 nM VEGFR2-huFc are added and further incubated for 1 hour at RT in the dark. Subsequently donor beads (10µg/ml) are added followed by incubation of 1 hour at RT in the dark. Fluorescence is measured by reading plates on the Envision Multi label Plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) using an excitation wavelength of 680 nm and an emission wavelength between 520 nm and 620nm. Periplasmic extract containing irrelevant VHH is used as negative control. Periplasmic extracts containing anti-VEGF165 VHHs which are able to

decrease the fluorescence signal with more than 60 % relative to the signal of the negative control are identified as a hit. All hits identified in the AlphaScreen are confirmed in a competition ELISA. To this end, 1 µg/mL of human VEGFR2 chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is coated in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Fivefold dilutions of the periplasmic extracts are incubated in the presence of a fixed concentration (4nM) of biotinylated human VEGF165 in PBS buffer containing 0.1 % casein and 0.05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich). Binding of these VHH/bio-VEGF165 complexes to the human VEGFR2 chimera coated plate is detected using horseradish peroxidase (HRP) conjugated extravidin (Sigma, St Louis, MO, USA). VHH sequence IDs and the corresponding AA sequences of inhibitory (receptor-blocking) VHHs and VEGF-binding (non-receptor-blocking) VHHs selected for further characterization are listed in Table 32 and Table 33, respectively.

Table 32: Sequence IDs and AA sequences of monovalent receptor-blocking anti-VEGF VHHs selected for further characterization (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR 1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 23A06 42	EVQLV ESGGG LVQPG DSLKL SCAFS GRTFS	SYS MG	WFR QAQ GKE REF VV	AISSG GFIYD AVSLE G	RFTI SRDN TKNT VYLQ TPSL KPED TAVY YCAA	SRAYG SSRLR LADTY DY	WGQGT QVTVS S

72

VEGFBII 23B04 **43**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREFVV	AISKGGYKYDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCAS	SRAYGSSRLRLADTYEY	WGQGTQVTVSS
VEGFBII 24C04 **44**	EVQLVESGGGLVQPGDSLKLSCVASGRTSS	SYSMG	WFRQAQGKEREFVV	AISSGGYIYDSVSLQG	RFTISRDNTKNTVYLQTPSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYDY	WGQGTQVTVSS

Table 33: Sequence IDs and AA sequences of monovalent non-receptor-blocking anti-VEGF VHHs selected for further characterization (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID/ **SEQ ID NO:**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
VEGFBII 05B05 **45**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFM	SMA	WYRQAPGKHRELVA	RISSGGTTAYVDSVKG	RFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNT	FSSRPNP	WGAGTQVTVSS
VEGFBII 10E07 **46**	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS	NYAMG	WFRQAPGKERVLVA	DISSSGINTYVADAVKG	RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA	SAWWYSQMARDNYRY	WGQGTQVTVSS
VEGFBII 86H09 **47**	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSAFK	SYRMG	WFRRTPGKEDEFVA	SISWTYGSTFYADSVKG	RFTMSRDKAKNAGYLQMNSLKPEDTALYYCAA	GAQSDRYNIRSYDY	WGQGTQVTVSS

Dissociation rates of receptor-blocking VHHs are analyzed on Biacore (Biacore T100 instrument, GE Healthcare). HBS-EP+ buffer is used as running buffer and experiments are performed at 25°C. Recombinant human VEGF165 is irreversibly captured on a CM5 sensor chip via amine coupling (using EDC and NHS) up to a target level of +/- 1500RU. After immobilization, surfaces are deactivated with 10 min injection of 1M ethanolamine pH8.5. A reference surface is activated and deactivated with respectively EDC/NHS and ethanolamine. Periplasmic extracts of VHHs are injected at a 10-fold dilution in running buffer for 2 min at 45µl/min and allowed to dissociate for 10 or 15 min. Between different samples, the surfaces are regenerated with regeneration buffer. Data are double referenced by subtraction of the curves on the reference channel and of a blank running buffer injection. The dissociation phase of the processed curves is evaluated by fitting a two phase decay model in the Biacore T100 Evaluation software v2.0.1. Values for k_d-fast, k_d-slow and % fast are listed in Table 34.

Table 34: Off-rate determination of receptor-blocking VHHs with Biacore

VHH ID	k_d(fast)	k_d(slow)	% fast	Binding level (RU)
VEGFBII23B04	8.80E-03	4.00E-05	12	768
VEGFBII24C04	1.30E-02	3.40E-05	17	456
VEGFBII23A06	1.70E-02	3.70E-05	13	547

73

Example 12

Characterization of purified anti-VEGF VHHs

Three inhibitory anti-VEGF VHHs are selected for further characterization as purified proteins: VEGFBII23B04, VEGFBII24C04 and VEGFBII23A06. These VHHs are expressed in E. *coli* TG1 as c-myc, His6-tagged proteins. Expression is induced by addition of 1 mM IPTG and allowed to continue for 4 hours at 37°C. After spinning the cell cultures, periplasmic extracts are prepared by freeze-thawing the pellets. These extracts are used as starting material for VHH purification via IMAC and size exclusion chromatography (SEC). Final VHH preparations show 95% purity as assessed via SDS-PAGE.

12.1 Evaluation of human VEGF165/VEGFR2 blocking VHHs in human VEGF165/human VEGFR2-Fc blocking ELISA

The blocking capacity of the VHHs is evaluated in a human VEGF165/human VEGFR2-Fc blocking ELISA. In brief, 1 µg/mL of VEGFR2-Fc chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is coated in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Dilution series (concentration range 1 mM - 64pM) of the purified VHHs in PBS buffer containing 0.1% casein and 0.05% Tween 20 (Sigma) are incubated in the presence of 4 nM biotinlyated VEGF165. Residual binding of bio-VEGF165 to VEGFR2 is detected using horseradish peroxidase (HRP) conjugated extravidin (Sigma, St Louis, MO, USA) and TMB as substrate. As controls Bevacizumab (Avastin® and Ranibizumab (Lucentis®) are taken along. Dose inhibition curves are shown in Figure 20, the corresponding IC_{50} values and % inhibition are summarized in Table 35.

Table 35: IC_{50} (nM) values and % inhibition for monovalent VHHs in hVEGF165/hVEGFR2-Fc competition ELISA

VHH ID	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII23B04	2.1	100
VEGFBII23A06	3.0	100
VEGFBII24C04	2.5	100
Ranibizumab	1.6	100
Bevacizumab	1.7	100

12.2 Evaluation of human VEGF165/VEGFR2 blocking VHHs in human VEGF165/human VEGFR1-Fc blocking ELISA

VHHs are also evaluated in a human VEGF165/human VEGFR1-Fc blocking ELISA. In brief, 2 µg/mL of VEGFR1-Fc chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) is coated in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Dilution series (concentration range 1 mM - 64pM) of the purified VHHs in PBS buffer containing 0.1% casein and 0.05% Tween 20 (Sigma) are incubated in the presence of 0.5nM biotinlyated VEGF165. Residual binding of bio-VEGF165 to VEGFR1 is detected using horseradish peroxidase (HRP) conjugated extravidin (Sigma, St Louis, MO, USA) and TMB as substrate. As controls Bevacizumab, Ranibizumab and an irrelevant VHH (2E6) are taken along. Dose inhibition curves are shown in Figure 21, the corresponding IC_{50} values and % inhibition are summarized in Table 36.

Table 36: IC_{50} (nM) values and % inhibition of monovalent VHHs in hVEGF165/hVEGFR1-Fc competition ELISA

VHH ID	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII23B04	0.5	64
VEGFBII23A06	0.9	55
VEGFBII24C04	0.8	71
Ranibizumab	1.2	91
Bevacizumab	1.5	96

12.3 Evaluation of the anti-VEGF165 VHHs in the human VEGF165/human VEGFR2-Fc blocking AlphaScreen

The blocking capacity of the VHHs is also evaluated in a human VEGF165/human VEGFR2-Fc blocking AlphaScreen. Briefly, serial dilutions of purified VHHs (concentration range: 200 nM – 0.7 pM) in PBS buffer containing 0.03 % Tween 20 (Sigma) are added to 4pM bio-VEGF165 and incubated for 15 min. Subsequently VEGFR2-Fc (0.4 nM) and anti-Fc VHH-coated acceptor beads (20 µg/ml) are added and this mixture is incubated for 1 hour in the dark. Finally, streptavidin donor beads (20 µg/ml) are added and after 1 hour of incubation in the dark, fluorescence is measured on the Envision microplate reader. Dose-response curves are shown in the Figure 22. The IC_{50} values for VHHs blocking the human VEGF165 – human VEGFR2-Fc interaction are summarized in Table 37.

Table 37: IC_{50} (pM) values and % inhibition for VHHs in hVEGF165/hVEGFR2-Fc competition AlphaScreen

VHH ID	IC_{50} (pM)	% inhibition
VEGFBII23B04	160	100
VEGFBII23A06	250	100
VEGFBII24C04	250	100
Ranibizumab	860	100

12.4 Evaluation of the anti-VEGF165 VHHs in the human VEGF165/human VEGFR1-Fc blocking AlphaScreen

The blocking capacity of the VHHs is also evaluated in a human VEGF165/human VEGFR1-Fc blocking AlphaScreen. Briefly, serial dilutions of purified VHHs (concentration range: 500 nM – 1.8 pM)) in PBS buffer containing 0.03 % Tween 20 (Sigma) are added to 0.4 nM bio-VEGF165 and incubated for 15 min. Subsequently VEGFR1-Fc (1 nM) and anti-Fc VHH-coated acceptor beads (20 µg/ml) are added and this mixture is incubated for 1 hour in the dark. Finally, streptavidin donor beads (20 µg/ml) are added and after 1 hour of incubation in the dark, fluorescence is measured on the Envision microplate reader. Dose-response curves are shown in the Figure 23. The IC_{50} values and % inhibition for VHHs blocking the human VEGF165 – human VEGFR1-Fc interaction are summarized in Table 38.

75

Table 38: IC_{50} (nM) values and % inhibiton for VHHs in hVEGF165/hVEGFR1-Fc competition AlphaScreen

VHH ID	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII23B04	0.9	41
VEGFBII23A06	0.4	46
VEGFBII24C04	0.2	53
Ranibizumab	3.3	79

12.5 Determination of the affinity of the human VEGF165 – VHH interaction

Binding kinetics of VHH VEGFBII23B4 with hVEGF165 is analyzed by SPR on a Biacore T100 instrument. Recombinant human VEGF165 is immobilized directly on a CM5 chip via amine coupling (using EDC and NHS). VHHs are analyzed at different concentrations between 10 and 360nM. Samples are injected for 2 min and allowed to dissociate up to 20 min at a flow rate of 45 µl/min. In between sample injections, the chip surface is regenerated with 100 mM HCl. HBS-EP+ (Hepes buffer pH7.4 + EDTA) is used as running buffer. Binding curves are fitted using a Two State Reaction model by Biacore T100 Evaluation Software v2.0.1. The calculated affinities of the anti-VEGF VHHs are listed in Table 39.

Table 39: Affinity K_D (nM) of purified VHHs for recombinant human VEGF165

	VEGF165						
VHH ID	**k_a ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**k_{a1} ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**k_{a2} ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**k_{d1} (s^{-1})**	**k_{d2} (s^{-1})**	**K_D (nM)**
VEGFBII23B 04[(a)]	-	2.1E+05	1.4E-02	-	8.6E-03	2.4E-04	0.7
VEGFBII23A 06[(a)]	-	4.2E+05	2.0E-02	-	5.7E-02	1.0E-04	0.7
VEGFBII24C 04[(a)]	-	3.2E+05	1.8E-02	-	2.6E-02	9.6E-05	0.4

[(a)] Heterogeneous binding curve resulting in no 1:1 fit, curves are fitted using a Two State Reaction model by Biacore T100 Evaluation Software v2.0.1

12.6 Binding to mouse VEGF164

Cross-reactivity to mouse VEGF164 is determined using a binding ELISA. In brief, recombinant mouse VEGF164 (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) is coated overnight at 4°C at 1 µg/mL in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1% in PBS). VHHs are applied as dilution series (concentration range: 500nM – 32pM) in PBS buffer containing 0.1% casein and 0.05% Tween 20 (Sigma) and binding is detected using a mouse anti-myc (Roche) and an anti-mouse-HRP conjugate (DAKO) and a subsequent enzymatic reaction in the presence of the substrate TMB (3,3',5,5'-tetramentylbenzidine) (Pierce, Rockford, IL, USA) (Figure 24). A mouse VEGF164 reactive mAb is included as positive control. As reference, binding to human VEGF165 is also measured. EC_{50} values are summarized in Table 40.

76

Table 40: EC_{50} (pM) values for VHHs in a recombinant human VEGF165 and mouse 164 binding ELISA

	rhVEGF165	rmVEGF164
VHH ID	**EC_{50} (pM)**	**EC_{50} (pM)**
VEGFBII23B04	297	NB
VEGFBII24C04	453	NB
VEGFBII23A06	531	NB

NB, no binding

12.7 Binding to VEGF121

Binding to recombinant human VEGF121 is assessed via a solid phase binding ELISA. Briefly, recombinant human VEGF121 (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) is coated overnight at 4°C at 1 µg/mL in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1% in PBS). VHHs are applied as dilution series (concentration range: 500nM – 32pM) in PBS buffer containing 0.1% casein and 0.05% Tween 20 (Sigma) and binding is detected using a mouse anti-myc (Roche) and an anti-mouse-HRP conjugate (DAKO) and a subsequent enzymatic reaction in the presence of the substrate TMB (3,3',5,5'-tetramentylbenzidine) (Pierce, Rockford, IL, USA) (Figure 25). As positive control serial dilutions of the VEGFR2 is taken along. EC_{50} values are summarized in Table 41.

Table 41: EC_{50} (pM) values for monovalent VHHs in a recombinant human VEGF121 binding ELISA

VHH ID	EC_{50} (pM)
VEGFBII23B04	510
VEGFBII24C04	792
VEGFBII23A06	928

12.8 Binding to VEGF family members VEGFB, VEGFC, VEGFD and PlGF

Binding to VEGFB, VEGFC, VEGFD and PlGF is assessed via a solid phase binding ELISA. In brief, VEGFB, VEGFC, VEGFD and PlGF (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) are coated overnight at 4°C at 1 µg/mL in a 96-well MaxiSorp plate (Nunc, Wiesbaden, Germany). Wells are blocked with a casein solution (1% in PBS). VHHs are applied as dilution series (concentration range: 500nM – 32pM) and binding is detected using a mouse anti-myc (Roche) and an anti-mouse-AP conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA). As positive controls serial dilutions of the appropriate receptors are taken along and detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgG, Fc specific antibody (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) and a subsequent enzymatic reaction in the presence of the substrate TMB (3,3',5,5'-tetramentylbenzidine) (Pierce, Rockford, IL, USA). Dose-response curves of VHHs and controls are shown in Figure 26. The results show that there is no detectable binding of the selected VHHs to VEGFB, VEGFC, VEGFD or PlGF.

12.9 Epitope binning

Biacore-based epitope binning experiments are performed to investigate which VEGF binders bind to a similar or overlapping epitope as VEGFBII23B04. To

77

this end, VEGFBII23B04 is immobilized on a CM5 sensor chip. For each sample, human VEGF165 is passed over the chip surface and reversibly captured by VEGFBII23B4. Purified VHHs (100 nM) or periplasmic extracts (1/10 diluted) are then injected with a surface contact time of 240 seconds and a flow rate of 10 uL/minute. Between different samples, the surface is regenerated with regeneration buffer (100 mM HCl). Processed curves are evaluated with Biacore T100 Evaluation software. VHHs could be divided within two groups: group one which gave additional binding to VEGFBII23B04 captured VEGF165 and a second group which is not able to simultaneously bind to VEGFBII23B04 captured VEGF165 (the selected VHHs 24C04, 23A06 and 23B04 are in this group).

The same assay set-up is used to assess whether VEGFR1, VEGFR2, Ranibizumab and Bevacizumab are able to bind to human VEGF-165 simultaneously with VEGFBII23B04. Table 42 presents the additional binding responses to VEGFBII23B04 captured VEGF165. Only VEGFR2 is not able to bind to VEGFBII23B04 captured VEGF165, underscoring the blocking capacity of VEGFBII23B04 for the VEGF-VEGFR2 interaction. In addition, these data show that the VEGFBII23B04 epitope does not correspond to the Bevacizumab and Ranibizumab epitope.

Table 42: Epitope binding of VEGFBII23B04 – binding of benchmark inhibitors or cognate receptors to VEGFBII23B04-captured VEGF165

Injection step	Binding	[sample]	Binding level (RU)
1	VEGF165	100 nM	1727
2	VEGFBII23B04	100 nM	-
3	Ranibizumab	100 nM	763
4	Bevacizumab	100 nM	1349
5	VEGFR1	100 nM	1011
6	VEGFR2	100 nM	-

12.10 Characterization of the anti-VEGF VHHs in the HUVEC proliferation assay

The potency of the selected VHHs is evaluated in a proliferation assay. In brief, primary HUVEC cells (Technoclone) are supplement-starved over night and then 4000 cells/well are seeded in quadruplicate in 96-well tissue culture plates. Cells are stimulated in the absence or presence of VHHs with 33ng/mL VEGF. The proliferation rates are measured by [^{3}H] Thymidine incorporation on day 4. The results of the HUVEC proliferation assay shown in Table 43 demonstrate that VEGFBII23B04 and Bevacizumab inhibit the VEGF-induced HUVEC proliferation by more than 90%, with IC50s <1nM.

Table 43: IC_{50} (nM) values and % inhibition of monovalent VEGFBII23B04, VEGFBII23A06 and VEGFBII24C04 in the VEGF HUVEC proliferation assay

VHH ID	***IC_{50} (nM)***	***% inhibition***
VEGFBII 23B04	0.36	91
Bevacizumab	0.21	92

VHH ID	***IC_{50} (nM)***	***% inhibition***
VEGFBII 23A06	4.29	73
VEGFBII 24C04	3.8	79
Bevacizumab	0.78	78

12.11 Characterization of the anti-VEGF VHHs in the HUVEC Erk phosphorylation assay

The potency of the selected VHHs is assessed in the HUVEC Erk phosphorylation assay. In brief, primary HUVEC cells are serum-starved over night and then stimulated in the absence or presence of VHHs with 10ng/mL

VEGF for 5 min. Cells are fixed with 4% Formaldehyde in PBS and ERK phosphorylation levels are measured by ELISA using phosphoERK-specific antibodies (anti-phosphoMAP Kinase pERK1&2, M8159, Sigma) and polyclonal Rabbit Anti-Mouse-Immunoglobulin-HRP conjugate (PO161, Dako). As shown in Table 44, VEGFBII23B4 and Bevacizumab inhibit the VEGF induced Erk phosphoryaltion by at least 90%, with IC_{50}s <1nM.

Table 44: IC_{50} (nM) values and % inhibition of monovalent VEGFBII23B04 in VEGF HUVEC Erk phosphorylation assay

VHH ID	***IC_{50} (nM)***	***% inhibition***
VEGFBII 23B04	*0.37*	*90*
Bevacizumab	*0.63*	*98*

Example 13

Generation of multivalent anti-VEGF blocking VHHs

VHH VEGFBII23B04 is genetically fused to either VEGFBII23B04 resulting in a homodimeric VHH or different VEGF-binding VHHs resulting in heterodimeric (bivalent) VHHs. To generate the bivalent VHHs, a panel of 10 unique VEGF-binding VHHs are linked via a 9 or 40 Gly-Ser flexible linker in two different orientations to VEGFBII23B04. Homodimeric VEGFBII23B04 (VEGFBII010) and the 40 heterodimeric bivalent VHHs are expressed in E. *coli* TG1 as c-myc, His6-tagged proteins. Expression is induced by addition of 1 mM IPTG and allowed to continue for 4 hours at 37°C. After spinning the cell cultures, periplasmic extracts are prepared by freeze-thawing the pellets. These extracts are used as starting material and VHHs are purified via IMAC and desalting resulting in 90% purity as assessed via SDS-PAGE. AA sequences the homodimeric and selected bivalent VEGF-binding VHHs are shown in SEQ ID NO: 48- 53 and in Table 45.

Table 45: Sequence ID, VHH ID and AA sequence of selected bivalent anti-VEGF VHHs

VHH ID/ SEQ ID NO:	VHH ID	AA sequence
VEGFBII23B04 -35GS-23B04 **48**	VEGFBII010	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGW FRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPE DTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04 -9GS-5B05 **49**	VEGFBII022	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCVASGIRFMSMAWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRF TISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSS
VEGFBII23B04 -40GS-5B05 **50**	VEGFBII021	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFMS MAWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLKAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSS
VEGFBII23B04 -40GS-10E07 **51**	VEGFBII023	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSN YAMGWFRQAPGKERVLVADISSSGINTYVADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAASAWWYSQMARDNYRYWGQGTQVTVSS

VEGFBII23B04-40GS-86H09 **52**	VEGFBII024	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSAFKS YRMGWFRRTPGKEDEFVASISWTYGSTFYADSVKGRFTMSRDKAKNAGY LQMNSLKPEDTALYYCAAGAQSDRYNIRSYDYWGQGTQVTVSS
VEGFBII10E07-40GS-23B04 **53**	VEGFBII025	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKERVLVA DISSSGINTYVADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASA WWYSQMARDNYRYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTF SSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVY LQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS

The panel of 40 bivalent VHHs is tested in the VEGFR2 and VEGFR1 blocking AlphaScreen assay, as described in Example 12.3 and 12.4, respectively. Based on potency and maximum level of inhibition, the best five bivalent VHHs (VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBI023, VEGFBI024 and VEGFBII025 – see Table 45) are chosen for further characterization. An overview of the screening results for the selected five bivalent VHHs in the competitive VEGFR2 and VEGFR1 AlphaScreen is shown in Table 46.

Table 46: Potency and efficacy of the five selected bispecific bivalent VHHs in the VEGF/VEGFR1 and VEGF/VEGFR2 competition AlphaScreen assay

VHH ID	**VEGFR2**	**VEGFR1**	
	IC_{50} (pM)	**IC_{50} (pM)**	**% inhibition**
VEGFBII021	9	16	100
VEGFBII022	7	8	100
VEGFBII023	38	44	91
VEGFBII024	12	46	100
VEGFBII025	51	39	82

Example 14

Characterization of formatted anti-VEGFVHHs

VHHs VEGFBII010, VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBII023, VEGFBII024 and VEGFBII025 are compared side-by side in the VEGFR2 and VEGFR1 blocking ELISA (Figure 27 and 28, Table 47 and Table 48 respectively) and AlphaScreen assay (Figure 29 and 30, Table 49 and 50) as described in Examples 12.1, 12.2, 12.3 and 12.4, respectively.

Table 47: IC_{50} (pM) values and % inhibition for formatted VHHs in hVEGF165/hVEGFR2-Fc competition ELISA

VHH ID	IC_{50} (pM)	% inhibition
VEGFBII010	49	100
VEGFBII021	204	100
VEGFBII022	164	100
VEGFBII023	213	100
VEGFBII024	292	100
VEGFBII025	577	100
Bevacizumab	315	100
Ranibizumab	349	100

Table 48: IC_{50} (pM) values and % inhibition of formatted VHHs in VEGF165/hVEGFR1-Fc competition ELISA

VHH ID	IC_{50} (pM)	% inhibition
VEGFBII010	73.5	67
VEGFBII021	254	97
VEGFBII022	225	89
VEGFBII023	279	91
VEGFBII024	326	92
VEGFBII025	735	91
Bevacizumab	484	91
Ranibizumab	594	96

Table 49: IC_{50} (pM) values and % inhibition for formatted VHHs in hVEGF165/hVEGFR2-Fc competition AlphaScreen

VHH ID	IC_{50} (pM)	% inhibition
VEGFBII010	16	100
VEGFBII021	7	100
VEGFBII022	7	100
VEGFBII023	46	100
VEGFBII024	50	100
VEGFBII025	51	100
Ranibizumab	600	100

Table 50: IC_{50} (pM) values and % inhibition of formatted VHHs in VEGF165/hVEGFR1-Fc competition AlphaScreen

VHH ID	IC_{50} (pM)	% inhibition
VEGFBII010	21	70
VEGFBII021	12	100
VEGFBII022	9	98
VEGFBII023	48	87
VEGFBII024	69	98
VEGFBII025	71	82
Ranibizumab	1300	87

In addition, formatted VHHs are also tested for their capacity to block the mVEGF164/mVEGFR2-huFc interaction. In brief, serial dilutions of purified VHHs (concentration range: 4μM – 14.5 pM) in PBS buffer containing 0.03 % Tween 20 (Sigma) are added to 0.1 nM biotinylated mVEGF164 and incubated for 15 min. Subsequently mouse VEGFR2-huFc (0.1 nM) and anti-huFc VHH-coated acceptor beads (20 μg/ml) are added and this mixture is incubated for 1 hour. Finally, streptavidin donor beads (20 μg/ml) are added and after 1 hour of incubation fluorescence is measured on the Envision microplate reader. Dose-response curves are shown in the Figure 31. The IC_{50} values for VHHs

blocking the mouse VEGF164/VEGFR2-huFC interaction are summarized in Table 51.

Table 51: IC_{50} (pM) values and % inhibition for formatted anti-VEGF VHHs in mVEGF164/mVEGFR2-hFc competition AlphaScreen

VHH ID	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII022	108	100
VEGFBII024	-	-
mVEGF164	0.05	100
Ranibizumab	-	-

The formatted VHHs are also tested in ELISA for their ability to bind mVEGF164 and rhVEGF165 (Example 12.6; Figure 32; Table 52), VEGF121 (Example 12.7; Figure 34; Table 53) and the VEGF family members VEGFB, VEGFC, VEGFD and PlGF (Example 12.8; Figure 33). Binding kinetics for human VEGF165 are analyzed as described in Example 12.5. The K_D values are listed in Table 54.

Table 52: EC_{50} (pM) values for formatted VHHs in a recombinant human VEGF165 and mouse VEGF164 binding ELISA

	rhVEGF165	rmVEGF164
VHH ID	EC_{50} (pM)	EC_{50} (pM)
VEGFBII010	428	-
VEGFBII021	334	502
VEGFBII022	224	464
VEGFBII023	221	-
VEGFBII024	320	-
VEGFBII025	668	-

Table 53: EC_{50} (pM) values for formatted VHHs in a recombinant human VEGF121 binding ELISA

	rhVEGF121
VHH ID	**EC_{50} (pM)**
VEGFBII010	920
VEGFBII022	540
VEGFBII024	325
VEGFBII025	475

Table 54: Affinity K_D (nM) of purified formatted VHHs for recombinant human VEGF165

VHH ID	**k_{a1} (1/Ms)**	**k_{d1} (1/s)**	**k_{a2} (1/s)**	**k_{d2} (1/s)**	**K_D (nM)[a]**
VEGFBII010 [b]	4.5E+05	1.7E-02	2.9E-02	1.3E-04	0.16
VEGFBII021[b]	1.2E+06	1.1E-02	2.3E-02	1.9E-04	0.07
VEGFBII022[b]	1.2E+06	9.1E-03	1.4E-02	2.6E-04	0.14
VEGFBII023[b]	3.0E+05	1.8E-02	2.4E-02	2.7E-04	0.69
VEGFBII024[b]	3.0E+05	1.3E-02	2.6E-02	2.8E-04	0.47
VEGFBII025[b]	3.3E+05	1.7E-02	1.8E-02	3.7E-04	1.1

[a] $K_D = k_{d1}/k_{a1} * (k_{d2}/(k_{d2}+k_{a2}))$

[b] Curves are fitted using a Two State Reaction model by Biacore T100 Evaluation Software v2.0.1

VHHs VEGFBII010, VEGFBII022, VEGFBII024 and VEGFBII025 are also tested in the VEGF mediated HUVEC proliferation and Erk phosphorylation assay.

The potency of the selected formatted VHHs is evaluated in a proliferation assay. In brief, primary HUVEC cells (Technoclone) are supplement-starved over night and then 4000 cells/well are seeded in quadruplicate in 96-well tissue culture plates. Cells are stimulated in the absence or presence of VHHs with 33ng/mL VEGF. The proliferation rates are measured by [^{3}H] Thymidine incorporation on day 4. The results shown in Table 55 demonstrate that the formatted VHHs and Bevacizumab inhibit the VEGF induced HUVEC proliferation by more than 90%, with IC_{50}s <1nM.

Table 55: IC_{50} (nM) values and % inhibition of formatted VHHs in VEGF HUVEC proliferation assay

VHH ID	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII010	0.22	95
VEGFBII021	0.40	98
VEGFBII022	0.34	100
VEGFBII023	0.52	98
VEGFBII024	0.38	96
VEGFBII025	0.41	104
Bevacizumab	0.21	92

The potency of the selected formatted VHHs is also assessed in the HUVEC Erk phosphorylation assay. In brief, primary HUVEC cells are serum-starved over night and then stimulated in the absence or presence of VHHs with 10ng/mL VEGF for 5 min. Cells are fixed with 4% Formaldehyde in PBS and ERK phosphorylation levels are measured by ELISA using phosphoERK-specific antibodies (anti-phosphoMAP Kinase pERK1&2, M8159, Sigma) and polyclonal Rabbit Anti-Mouse-Immunoglobulin-HRP conjugate (PO161, Dako). As shown in Table 56, the formatted VHHs and Bevacizumab inhibit the VEGF induced Erk phosphoryaltion by more than 90%, with IC_{50}s <1nM.

Table 56: IC_{50} (nM) values and % inhibition of formatted VHHs in VEGF HUVEC Erk phosphorylation assay

VHH ID	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII010	0.19	92
VEGFBII021	0.21	103
VEGFBII022	0.18	94
VEGFBII023	0.25	100
VEGFBII024	0.23	94
VEGFBII025	0.23	99
Bevacizumab	0.63	98

Example 15

Sequence optimization

15.1 Sequence optimization of VEGFBII23B04

The amino acid sequence of VEGFBII23B04 is aligned to the human germline sequences VH3-23 (DP-47) and JH5, see Figure 35 SEQ ID NO: 100. The alignment shows that VEGFBII23B04 contains 19 framework mutations relative to the reference germline sequence. Non-human residues at positions 14, 16, 23, 24, 41, 71, 82, 83 and 108 are selected for substitution with their human germline counterparts. A set of 8 VEGFBII23B04 variants is generated carrying different combinations of human residues on these positions (AA sequence are listed in Table 57). One additional variant is constructed in which the potential isomeriation site at position D59S60 (CDR2 region, see Figure 35 indicated as bold italic residues) is removed by introduction of a S60A mutation.

Table 57: AA sequences of sequence-optimized variants of VHH VEGFBII23B04 (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID/SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 111D05 54	EVQLVESG GGLVQTGG SLRLSCEA SGRTFS	SYSM G	WFRQAPGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISRDNAKNTV YLQINSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S
VEGFBII 111G06 55	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA SGRTFS	SYSM G	WFRQAPGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISRDNAKNTV YLQMNSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S
VEGFBII 112D11 56	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCEA SGRTFS	SYSM G	WFRQAPGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISRDNAKNTV YLQINSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S
VEGFBII 113A08 57	EVQLVESG GGLVQTGG SLRLSCEV SGRTFS	SYSM G	WFRQAPGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISKDNAKNTV YLQINSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S

VEGFBII 113E03 **58**	EVQLVESG GGLVQTGD SLRLSCEV SGRTFS	SYSM G	WFRQAQGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISKDNAKNTV YLQMNSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S
VEGFBII 114C09 **59**	EVQLVESG GGLVQPGD SLRLSCEV SGRTFS	SYSM G	WFRQAPGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISKDNAKNTV YLQINSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S
VEGFBII 114D02 **60**	EVQLVESG GGLVQTGG SLRLSCEV SGRTFS	SYSM G	WFRQAPGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISRDNAKNTV YLQINSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S
VEGFBII11 4D03 **61**	EVQLVESG GGLVQTGD SLRLSCAV SGRTFS	SYSM G	WFRQAQGKE REFVV	AISKGG YKYDSV SLEG	RFTISKDNAKNTV YLQINSLRPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTLVTVS S
VEGFBII11 8E10 **62**	EVQLVESG GGLVQTGD SLRLSCEV SGRTFS	SYSM G	WFRQAQGKE REFVV	AISKGG YKYDAV SLEG	RFTISKDNAKNTV YLQINSLKPEDTA VYYCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGTQVTVS S

These variants are characterized as purified proteins in the VEGF165/VEGFR2 AlphaScreen (Example 12.3, Figure 36). The melting temperature (T_m) of each clone is determined in a thermal shift assay, which is based on the increase in fluorescence signal upon incorporation of Sypro Orange (Invitrogen) (Ericsson et al, Anal. Biochem. 357 (2006), pp289-298). All variants displayed comparable IC_{50} when compared to VEGFBII23B04 and T_m values which are similar or higher when compared to the parental VEGFBII23B04. Table 58 summarizes the IC_{50} values, % inhibition and T_m values at pH 7 for the 9 clones tested.

Table 58: IC_{50} (pM) values, % inhibition and melting temperature (@pH 7) of sequence-optimized variants of VEGFBII23B04

VHH ID	IC_{50} (pM)	% inhibition	T_m @ pH 7 (°C)
VEGFBII23B04 (wt)	*169*	*100*	*63*
VEGFBII111D05	209	100	68
VEGFBII111G06	366	100	71
VEGFBII112D11	221	100	70
VEGFBII113A08	253	100	69
VEGFBII113E03	290	100	68
VEGFBII114C09	215	100	71
VEGFBII114D02	199	100	74
VEGFBII114D03	227	100	64
VEGFBII118E10	189	100	62

In a second cycle, tolerated mutations from the humanization effort (VEGFBII111G06) and mutations to avoid potential posttranslational modification at selected sites, (the D16G, the S60A substitution and an E1D mutation) are combined resulting in a sequence-optimized clone derived from VEGFBII23B04: VEGFBII0037. One extra sequence-optimized variant (VEGFBII038) is anticipated which contains all substitutions as VEGFBII0037,

64

with the exception of the I82M mutation, as this mutation may be associated with a minor drop in potency. The sequences of both sequence-optimized clones are listed in Table 59. VEGFBII0037 and VEGFBII0038 are characterized in the VEGF165/VEGFR2 blocking AlphaScreen (Example 13.3, Figure 37), the melting temperature is determined in the thermal shift assay as described above and the affinity for binding on VEGF165 is determined in Biacore (Example 13.5). An overview of the characteristics of the 2 sequence-optimized VHHs is presented in Table 60.

Table 59: AA sequences of sequence-optimized variants of VHH VEGFBII23B04

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR 1	CDR 1	FR2	CDR 2	FR3	CDR 3	FR 4
VEGFBII 037 63	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYS MG	WFRQ APGK EREF VV	AISKGG YKYDAV SLEG	RFTISRD NAKNTVY LQMNSLR PEDTAVY YCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGT LVTVS S
VEGFBII 038 64	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYS MG	WFRQ APGK EREF VV	AISKGG YKYDAV SLEG	RFTISRD NAKNTVY LQINSLR PEDTAVY YCAS	SRAYGSS RLRLADT YEY	WGQGT LVTVS S

Table 60: IC_{50} (pM) values, % inhibition, melting temperature (@pH 7) and affinity (pM) of sequence-optimized clones VEGFBII037 and VEGFBII038

VHH ID	IC_{50} (pM)	% inhibition	T_m (°C) @ pH 7	K_D (pM)
VEGFBII23B04	*152*	*100*	*63*	*560*
VEGFBII037	300	100	72	270
VEGFBII038	143	100	71	360

15.2 Sequence optimization of VEGFBII5B05

The amino acid sequence of VEGFBII5B05 is aligned to the human germline sequence VH3-23/JH5; see Figure 38 and SEQ ID NO: 100. The alignment shows that VEGFBII5B05 contains 15 framework mutations relative to the reference germline sequence. Non-human residues at positions 23, 60, 83, 105, 108 are selected for substitution with their human germline counterparts while the histidine at position 44 is selected for substitution by glutamine. One humanization variant is constructed carrying the 6 described mutations (AA sequence is listed in Table 61).

Table 61: AA sequence of sequence-optimized variants of VHH VEGFBII5B05 (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR 1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 119G11 65	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS GIRFM	SMA	WYRQAP GKQRELV A	RISSGG TTAYAD SVKG	RFTISRDNSK NTVYLQMNS LRAEDTAVYY CNT	FSSRP NP	WGQGTLV TVSS

VEGFBII 120E10 66	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCVAS GIRFI	SMA	WYRQAP GKHRELV A	RISSGG TTAYVD SVKG	RFTISRDNSK NTVYLQMNS LKAEDTAVYY CNT	FSSRP NP	WGAGTQV TVSS

One additional variant is constructed in which the potential oxidation site at position M30 (CDR1 region, see Figure 38 indicated as bold italic residue) is removed by introduction of a M30I mutation. Both variants are tested for their ability to bind hVEGF165 using the ProteOn. In brief, a GLC ProteOn Sensor chip is coated with human VEGF165. Periplasmic extracts of the variants are diluted 1/10 and injected across the chip coated with human VEGF165. Off-rates are calculated and compared to the off-rates of the parental VEGFBII5B05. Off-rates from the 2 variants are in the same range as the off-rates from the parental VEGFBII5B05 indicating that all mutations are tolerated (Table 62).

Table 62: Off-rates sequence-optimized variants VEGFBII5B05

VHH ID	binding level (RU)	k_d (1/s)
VEGFBII5B05	*242*	*6.15E-02*
VEGFBII119G11	234	7.75E-02
VEGFBII120E10	257	4.68E-02

In a second cycle, mutations from the humanization effort and the M30I substitution are combined resulting in a sequence-optimized clone of VEGFBII5B05, designated VEGFBII032. The sequence is listed in Table 63. Affinity of VEGFBII032 is determined by Biacore (see Example 12.5) and the melting temperature is determined in the thermal shift assay as described

above. An overview of the characteristics of the sequence-optimized VHH VEGFBII032 is presented in Table 64.

Table 63: AA sequence of sequence-optimized clone VEGFBII032 (FR, framework; CDR, complementary determining region)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR 1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 032 67	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGIRFI	SMA	WYRQA PGKQRE LVA	RISSGG TTAYAD SVKG	RFTISRDNS KNTVYLQM NSLRAEDT AVYYCNT	FSSRP NP	WGQGTLV TVSS

Table 64: Melting temperature (@pH 7) and affinity (nM) of sequence-optimized clone VEGFBII032

VHH ID	T_m (°C) @ pH 7	K_D (nM)
VEGFBII5B05(wt)	*69*	*32*
VEGFBII0032	71	44

The potency of the sequence-optimized clones VEGFBII037 and VEGFBII038 is evaluated in a proliferation assay. In brief, primary HUVEC cells (Technoclone) are supplement-starved over night and then 4000 cells/well are seeded in quadruplicate in 96-well tissue culture plates. Cells are stimulated in the absence or presence of VHHs with 33ng/mL VEGF. The proliferation rates are measured by [^{3}H] Thymidine incorporation on day 4. The results shown in Table 65 demonstrate that the activity (potency and degree of inhibition) of the parental VHH VEGFBII23B04 is conserved in the sequence-optimized clone VEGFBII038.

86

Table 65: IC_{50} (nM) values and % inhibition of the sequence optimized clones VEGFBII037 and VEGFBII038 in VEGF HUVEC proliferation assay

VHH ID	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII23B04	0.68	92
VEGFBII037	1.54	78
VEGFBII038	0.60	92
Bevacizumab	0.29	94

Example 16

Construction and characterization of bispecific VHHs targeting VEGF and DLL4 using PEGylation or anti-serum albumin binding as half-life extension

In a first cycle, VEGFBII23B04 and DLLBII101G08 are used as building blocks to generate bispecific VHHs VEGFDLLBII001-006. Two half-life extension methodologies are applied: i) PEGylation or ii) genetic fusion to a serum albumin binding VHH. Building blocks are linked via a 9 Gly-Ser, 35 Gly-Ser or 35 Gly-Ser (Cys at position 15) flexible linker. An overview of the format and sequence of all 6 bispecific VHHs is depicted in Table 66-A (linker sequences are underlined), SEQ ID Nos: 68 – 73 and in Figure 39.

Table 66-A: Sequences of bispecific VHHs targeting VEGF and DLL4

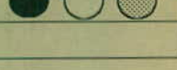
VHH ID/ SEQ ID NO:	AA sequence
VEGFDLLBII001 68	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQ GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWF RQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFDLLBII002 69	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEG RFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMA WFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRA ADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSS
VEGFDLLBII003 70	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEG RFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQA PGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRL GPYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVTVSS
VEGFDLLBII004 71	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEG RFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSS
VEGFDLLBII005 72	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQ GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQG KEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLR LADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVTVSS

87

	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQ
	GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGG
VEGFDLLBII006	GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
73	VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL
	VESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTI
	SKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS

To explore the anti-VEGF blocking properties in comparison with the monovalent building block VEGFBII23B04, all six VHHs are analyzed in the VEGF/VEGFR2-Fc (Example 12.3; Figure 41) and VEGF/VEGFR1-Fc (Example 12.4; Figure 42) competition AlphaScreen. These 2 competition assays are also performed after preincubation of the VHHs with 5 µM human serum albumin. A summary of IC_{50} values is shown in Table 66-B

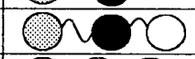
Table 66-B: IC_{50} values (nM) and % inhibition in VEGF/VEGFR1 and VEGF/VEGFR2 competition AlphaScreen (see Figure 39 for a description of the VHH format)

		VEGFR1				VEGFR2			
VHH ID	**Format**	**- HSA**		**+ HSA**		**- HSA**		**+ HSA**	
		IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh
VEGFBII23B04		0.45	48	n/d	n/d	0.22	100	0.30	100
VEGFDLLBII001		1.58	69	n/d	n/d	0.64	100	0.64	100
VEGFDLLBII002		0.36	64	n/d	n/d	0.20	100	0.24	100
VEGFDLLBII003		0.37	57	1.63	66	0.20	100	0.77	100
VEGFDLLBII004		0.47	57	0.56	70	0.20	100	0.37	100
VEGFDLLBII005		1.44	62	1.82	75	0.84	100	1.42	100
VEGFDLLBII006		2.07	67	2.41	75	1.16	100	2.22	100
Ranibizumab		5.88	70	n/d	n/d	0.90	100	n/d	n/d

n/d, not determined

To explore the anti-DLL4 blocking properties in comparison with the monovalent building block DLLBII101G08, all six VHHs are tested in the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc competitive FMAT assay (Example 4; Figure 43). This assay is also performed after preincubation of the VHHs with 25 µM human serum albumin. A summary of IC_{50} values is shown in Table 67.

Table 67: IC_{50} values (nM) in CHO-hDLL4 competition FMAT. See Figure 39 for a description of the VHH format.

		CHO-hDLL4 IC_{50} (nM)	
VHH ID	**Format**	**- HSA**	**+ HSA**
DLLBII101G08		31.0	30.1
VEGFDLLBII001		128.5	121.6
VEGFDLLBII002		105.9	119.9
VEGFDLLBII003		61.8	45.1
VEGFDLLBII004		43.0	23.1
VEGFDLLBII005		181.2	60.7
VEGFDLLBII006		54.9	47.6
DLL4 Fab		2.0	n/d

n/d, not determined

In a second cycle, seven bispecific VHHs targeting VEGF and DLL4 are constructed (VEGFDLLBII010, VEGFDLLBII011, VEGFDLLBII012, VEGFDLLBII013, VEGFDLLBII014, VEGFDLLBII015, VEGFDLLBII016). In these constructs, the DLLBII101G08 affinity-matured VHH DLLBII129B05 or the DLLBII115A05 affinity-matured VHH DLLBII136C07 are included. Additionally, in 2 constructs the bivalent anti-VEGF VHH comprising VEGFBII23B04 and VEGFBII5B05 is included. Two half-life extension methodologies are applied: i) PEGylation or ii) genetic fusion to a serum albumin binding VHH. Building blocks are linked via a 9 Gly-Ser, 35 Gly-Ser or 35 Gly-Ser (Cys at position 15) flexible linker. An overview of the format and

sequence of all seven bispecific VHHs is depicted in Table 68-A (linker sequences are underlined), SEQ ID NOs: 74 – 80 and Figure 40.

To explore the anti-VEGF blocking properties in comparison with the monovalent building block VEGFBII23B04, all seven VHHs are characterized in the VEGF/VEGFR2-Fc (Example 12.3; Figure 44) and VEGF/VEGFR1-Fc (Example 12.4; Figure 45) competition AlphaScreen. These 2 competition assays are also performed after preincubation of the VHHs with 5 µM human serum albumin. A summary of IC_{50} values is shown in Table 68-B.

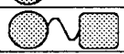
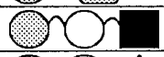
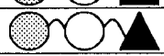
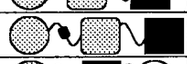
Table 68-A: Sequences of bispecific VHHs targeting VEGF and DLL4

VHH ID/ SEQ ID NO:	AA sequence
VEGFDLLBII310 74	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKCGYKYDCVSLE GRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYAD SVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSS
VEGFDLLBII311 75	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKCGYKYDCVSLE GRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYDMSWVRRSPGKGPEWVSSINSGGGSTYYAD YVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRYIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTQVTV SS
VEGFDLLBII312 76	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLE GRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSY DMSWVRRSPGKGPEWVSSINSGGGSTYYADYVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC AADRYIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTQVTVSS
VEGFDLLBII313 77	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLE GRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSY AMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC ANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSS

VEGFDLLBII014 78	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLE GRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFMSMAWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYV DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSSGGGGSGGGG SGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYR QAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAPD TRLAPYEYDHWGQGTQVTVSS
VEGFDLLBII015 79	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLE GRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFMSM AWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNTF SSRPNPWGAGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAK NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSS
VEGFDLLBII016 80	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLE GRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSY AMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC ANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFT FSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS

89

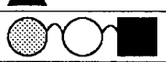
Table 68-B: IC_{50} values (nM) and % inhibition in VEGF/VEGFR1 and VEGF/VEGFR2 competition AlphaScreen (see Figure 40 for description of the VHH format; linker sequences are underlined) SEQ ID NO: 74 - 80

		VEGFR1				VEGFR2			
		- HSA		+ HSA		- HSA		+ HSA	
VHH ID	**Format**	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh
VEGFBII23B04		0.43	44	n/d	n/d	0.19	100	0.20	100
VEGFBII022		n/d	n/d	n/d	n/d	0.017	100	n/d	n/d
VEGFDLLBII010		0.27	49	0.61	64	0.12	100	0.21	100
VEGFDLLBII011		0.60	65	0.36	68	0.17	100	0.25	100
VEGFDLLBII012		0.27	60	n/d	n/d	0.19	100	0.22	100
VEGFDLLBII013		0.24	62	n/d	n/d	0.18	100	0.17	100
VEGFDLLBII014		0.080	94	n/d	n/d	0.026	100	0.024	100
VEGFDLLBII015		0.040	96	n/d	n/d	0.016	100	0.015	100
VEGFDLLBII016		0.32	59	0.85	65	0.16	100	0.47	100
Ranibizumab		0.43	n/d	n/d	n/d	0.19	100	0.20	100

n/d, not determined

To explore the anti-DLL4 blocking properties in comparison with the monovalent affinity-matured building blocks DLLBII129B05 and DLLBII136C07, all seven VHHs are evaluated in the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc competitive FMAT assay (Example 4; Figure 46) and the DLL4-mediated reporter assay (Example 12.5; Figure 47). These assays are also performed after preincubation of VHHs with 25 µM (FMAT assay) or 175 µM (reporter assay) human serum albumin. A summary of IC_{50} values is shown in Table 69.

Table 69: IC_{50} values (nM) in CHO-hDLL4/CHO-mDLL4 competition FMAT, and DLL4 mediated reporter assay (see Figure 40 for a description of the VHH format). (*, no full dose response curve)

		CHO-hDLL4				CHO-mDLL4				reporter
VHH ID	Format	- HSA		+ HSA		- HSA		+ HSA		+ HSA
		IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	
DLLBII129B05		3.2	90	4.3	90	3.0	100	3.7	100	88.0
DLLBII136C07		6.8	94	7.1	94	16.4	100	17.6	100	103.0
VEGFDLLBII010		4.9	90	5.3	100	5.4	95	3.9	100	209.1
VEGFDLLBII011		12.6	83	11.4	100	24.1	*	33.9	100	589.9
VEGFDLLBII012		44.9	100	41.5	100	95.3	100	102.7	100	582.2
VEGFDLLBII013		12.2	100	12.4	100	19.3	100	23.8	100	98.5
VEGFDLLBII014		9.9	100	12.3	100	15.4	100	15.4	100	122.5
VEGFDLLBII015		9.5	100	10.0	100	12.2	100	11.2	100	134.3
VEGFDLLBII016		5.2	90	5.8	100	4.5	95	4.9	100	257.7
DLL4 Fab		2.4	100	2.1	100	1.0	100	1.1	100	16.4

Finally, in a third cycle, the bispecific VHHs A1, A2, A3 and HSA1-6 are constructed. The following building blocks are used to generate these constructs: VEGFBII038 (sequence-optimized variant of VEGFBII23B04), VEGFBII032 (sequence-optimized variant of VEGFBII5B05), DLLBII018 (sequence-optimized variant of DLLBII129B05) and DLLBII039 (sequence-optimized variant of DLLBII136C7). Three half-life extension methodologies are applied: i) PEGylation, ii) genetic fusion to a serum albumin binding VHH and iii) genetic fusion to human serum albumin. Building blocks are linked via a 9 Gly-Ser, 35 Gly-Ser or 35 Gly-Ser (Cys at position 15) flexible linker. An overview of the format and sequence of all three bispecific VHHs is depicted in Table 70-A, SEQ ID Nos: 81 – 89 and in Figure 48.

96

To explore the anti-VEGF blocking properties in comparison with the monovalent sequence optimized building block VEGFBII038 or biparatopic sequence optimized building block VEGFBII022, all seven VHHs are characterized in the VEGF/VEGFR2-Fc (Example 12.3; Figure 49) and VEGF/VEGFR1-Fc (Example 12.4; Figure 50) competition AlphaScreen. These 2 competition assays are also performed after preincubation of the VHHs with 5 µM human serum albumin. A summary of IC_{50} values is shown in Table 70-B.

Table 70-A: Sequences of bispecific VHHs targeting VEGF and DLL4

VHH ID/SEQ ID NO:	AA sequence
A1/**81**	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAP GKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSS
A2/**82**	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGK EREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSS

A3/**83**	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGK QRELVARISSGGTTAYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNTFSSRPNPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGK EREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSS
HSA1/**84**	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVA ISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRA YGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQA PGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPED TAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSSDAHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLH TLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTE CCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPH ECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETC FAEEGKKLVAASQAALGL

HSA2/85	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVA ISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRA YGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVARISSGGTTAYADSVKGRFT ISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTL VTVSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAK QRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTEC CHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEN DEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDE TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

HSA3/86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIGSYDMSWVRRAPGKGPEWVSS ISSGGGSTYYADYVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR YIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWF RQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRP EDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVARISSGG TTAYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTFSSRPNPW GQGTLVTVSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLY EIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGK ASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCI AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD YSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT KEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

92

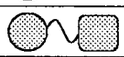
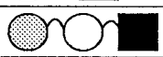
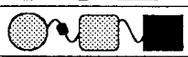
HSA4/87	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVA ISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRA YGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQA PGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPED TAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQ QCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE TFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKL DELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGK VGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAA LGL

HSA5/**88**	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVA ISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRA YGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVARISSGGTTAYADSVKGRFT ISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHR FKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADL AKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKC CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVR YTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

93

HSA6/**89**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIGSYDMSWVRRAPGKGPEWVSS ISSGGGSTYYADYVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR YIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWF RQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRP EDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVARISSGG TTAYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTFSSRPNPW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKS EVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQH KDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELL FFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSL AADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQN ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Table 70-B: IC_{50} values (nM) and % inhibition in VEGF/VEGFR1 and VEGF/VEGFR2 competition AlphaScreen (see Figure 48 for a description of the VHH format). All molecules showed 100% inhibition in VEGF/VEGFR2 AlphaScreen assay.

		VEGFR1				VEGFR2			
		- HSA		+ HSA		- HSA		+ HSA	
VHH ID	**Format**	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh
VEGFBII038		0.2	50	n/d	n/d	0.2	100	0.1	100
VEGFBII022		0.07	87	n/d	n/d	0.05	100	0.03	100
A1		0.1	80	n/d	n/d	0.07	100	n/d	n/d
A2		0.3	71	0.3	63	0.2	100	0.2	100
A3		0.02	97	n/d	n/d	0.01	100	n/d	n/d
HSA1		0.7	63	n/d	n/d	0.4	100	n/d	n/d
HSA2		0.09	93	n/d	n/d	0.01	100	n/d	n/d
HSA3		0.1	93	n/d	n/d	0.01	100	n/d	n/d
HSA4		0.5	66	n/d	n/d	0.3	100	n/d	n/d

n/d, not determined

Legend:

Nanobody, linker or HSA	description
	DLLBII018
	DLLBII039
	VEGFBII038
	VEGFBII032
	HSA
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

94

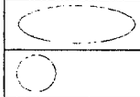
To explore the anti-DLL4 blocking properties in comparison with the monovalent sequence-optimized building blocks DLLBII018 and DLLBII039, all seven VHHs are evaluated in the CHO-hDLL4/hNotch1-Fc and CHO-mDLL4/hNotch1-Fc competitive FMAT assay (Example 4; Figure 51). These assays are also performed after preincubation of VHHs with 25 μM (FMAT assay) human serum albumin. A summary of IC_{50} values is shown in Table 71.

Table 71: IC_{50} values (nM) in CHO-hDLL4/CHO-mDLL4 competition FMAT, and DLL4 mediated reporter assay (see Table 70-A, Figure 48 and SEQ ID Nos: 81 - 89 for a description of the format).

		CHO-hDLL4				CHO-mDLL4			
		- HSA		+ HSA		- HSA		+ HSA	
VHH ID	Format	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh	IC_{50} (nM)	% inh
DLLBII018		5.5	87	7.1	100	2.4	99	2.8	100
DLLBII039		3.6	102	n/d	n/d	6.7	100	n/d	n/d
A1		6.7	102	n/d	n/d	3.4	100	n/d	n/d
A2		9.9	73	17.9	100	5.2	91	5.7	100
A3		16.1	97	n/d	n/d	7.9	95	n/d	n/d
HSA1		8.1	96	n/d	n/d	4.8	100	n/d	n/d
HSA2		17.3	87	n/d	n/d	7.4	100	n/d	n/d
HSA3		11.5	100	n/d	n/d	28.7	100	n/d	n/d
HSA4		9.3	93	n/d	n/d	5.3	100	n/d	n/d
DLL4 Fab		7.7	100	7.5	100	1.9	100	2.4	100

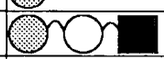
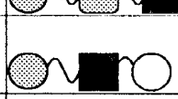
n/d, not determined

Legend:

Nanobody, linker or HSA	description
	DLLBII018
	DLLBII039
	VEGFBII038
	VEGFBII032
	HSA
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

The potency of the bispecific VHHs is evaluated in the VEGF proliferation assay. In brief, primary HUVEC cells (Technoclone) are supplement-starved over night and then 4000 cells/well are seeded in quadruplicate in 96-well tissue culture plates. Cells are stimulated in the absence or presence of VHHs with 33ng/mL VEGF. This assay is performed after preincubation of the VHHs with 520 nM human serum albumin, as indicated. The proliferation rates are measured by [^{3}H] Thymidine incorporation on day 4. The results shown in Table 72 demonstrate that the bispecific VHHs and Bevacizumab inhibit the VEGF induced HUVEC proliferation by more than 90%, with IC_{50}s <1nM.

Table 72: IC_{50} (nM) values and % inhibition of bispecific VHHs in VEGF HUVEC proliferation assay

		- HSA		+ HSA	
VHH ID	**Format**	IC_{50} (nM)	% inhibition	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII23B04		0.78	87	0.69	95
VEGFDLLBII010		n/d	n/d	0.60	94
VEGFDLLBII013		0.73	92	n/d	n/d
VEGFDLLBII014		0.49	98	n/d	n/d
VEGFDLLBII015		0.49	109	n/d	n/d
VEGFDLLBII016		n/d	n/d	0.72	95
Bevacizumab		0.22	92	0.26	96

Legend:

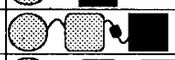
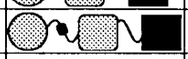
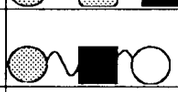
Nanobody or linker	**description**
	DLLBII129B05
	VEGFBII23B04
	5B05
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

n/d, not determined

The potency of the bispecific VHHs is assessed in the VEGF HUVEC Erk phosphorylation assay. In brief, primary HUVEC cells are serum-starved over night and then stimulated in the absence or presence of VHHs with 10ng/mL VEGF for 5 min. This assay is performed after preincubation of the VHHs with 250 nM human serum albumin, as indicated. Cells are fixed with 4%

Formaldehyde in PBS and ERK phosphorylation levels are measured by ELISA using phosphoERK-specific antibodies (anti-phosphoMAP Kinase pERK1&2, M8159, Sigma) and polyclonal Rabbit Anti-Mouse-Immunoglobulin-HRP conjugate (PO161, Dako). As shown in Table 73, the bispecific VHHs and Bevacizumab inhibit the VEGF induced Erk phosphoryaltion by more than 90%, with IC_{50}s <1nM.

Table 73: IC_{50} (nM) values and % inhibition of bispecific VHHs in VEGF HUVEC Erk phosphorylation assay

		- HSA		+ HSA	
VHH ID	**Format**	IC_{50} (nM)	% inhibition	IC_{50} (nM)	% inhibition
VEGFBII23B04		0.69	91	0.60	93
VEGFDLLBII010		n/d	n/d	0.74	94
VEGFDLLBII013		0.89	95	n/d	n/d
VEGFDLLBII014		0.53	101	n/d	n/d
VEGFDLLBII015		0.40	106	n/d	n/d
VEGFDLLBII016		n/d	n/d	1.03	93
Bevacizumab		0.68	99	0.83	98

n/d, not determined

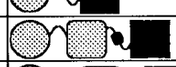
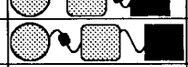
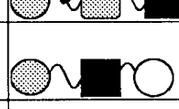
Legend:

Nanobody or linker	**description**
	DLLBII129B05
	VEGFBII23B04
	5B05
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

96

The potency of the bispecific VHHs is evaluated in the Dll4 HUVEC proliferation assay, as described by Ridgway *et al.*, Nature. 2006 Dec 21; 444 (7122):1083-7, in modified form. In brief, 96-well tissue culture plates are coated with purified Dll4-His (RnD Systems; C-terminal His-tagged human Dll4, amino acid 27-524, 0.75ml/well, 10 ng/ml) in coating buffer (PBS, 0.1% BSA). Wells are washed in PBS before 4000 HUVEC cells/well are seeded in quadruplicate. This assay is performed after preincubation of the VHHs with 50 μM human serum albumin, as indicated. Cell proliferation is measured by [^{3}H]-Thymidine incorporation on day 4. The IC_{50} values of the bispecific VHHs and the DLL4 Fab are summarized in Table 74.

Table 74: IC_{50} (nM) values and inhibition of bispecific VHHs in Dll4-mediated HUVEC proliferation assay

		- HSA		**+ HSA**	
VHH ID	**Format**	IC_{50} (nM)	inhibition	IC_{50} (nM)	inhibition
VEGFBII129B05		2.32	complete	3.52	complete
VEGFDLLBII010		n/d	complete	3.39	complete
VEGFDLLBII013		2.06	complete	n/d	complete
VEGFDLLBII014		0.53	complete	n/d	complete
VEGFDLLBII015		0.28	complete	n/d	complete
VEGFDLLBII016		n/d	complete	35.22	complete
DLL4 Fab		7.85	complete	2.79	complete

Legend:

Nanobody or linker	description
	DLLBII129B05
	VEGFBII23B04
	5B05
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

Example 17:

Efficacy of selected binding molecules in a mouse model of human colon cancer

The efficacy of the three selected VHHs VEGFDLLBII010, VEGFDLLBII013 and VEGFDLLBII015 is assessed in a mouse model of human colon cancer (cell line SW620) in nude mice.

SW620 cells are obtained from ATCC (CCL-227). Cells are cultured in T175 tissue culture flasks at 37 °C and 0% CO_2. The medium used is Leibovitz's L-15 Medium (Gibco Cat. 11415) and 10% fetal calf serum (JRH Cat. 12103-1000ml). Cultures are split at subconfluency with a split ratio of 1:10 or 1:20. Mice are 7 week-old athymic female BomTac:NMRI-*Foxn1*^{nu} , purchased from Taconic, Denmark. To establish subcutaneous tumors, SW620 cells are trypsinized, washed, resuspended in PBS + 5% FCS at 5 x 10^7/ml. 100 µl cell suspension containing 5 x 10^6 cells are then injected subcutaneously into the right flank of the mice (one site per mouse). When tumors are well established and have reached volumes of 47 to 93 mm^3 (10 days after injecting the cells),

97

mice are randomly distributed between the treatment and the vehicle control groups.

VHHs are diluted with PBS.

The doses are calculated to the Avastin (bevacizumab) equivalent doses of 7.5 mg/kg, 2.5 mg/kg and 15 mg/kg, respectively (Table 75). All doses are calculated according to the average body weight of all mice on day 0 (27.7 g) and administered in a volume of 100 µl per mouse. VHHs are administered daily or every second day intraperitoneally. Day 1 is the first, day 21 the last day of treatment.

Tumor diameters are measured three times a week (Monday, Wednesday and Friday) with a caliper. The volume of each tumor [in mm^3] is calculated according to the formula "tumor volume = length * $diameter^2$ * $\pi/6$." To monitor side effects of treatment, mice are inspected daily for abnormalities and body weight is determined three times a week (Monday, Wednesday and Friday). Animals are sacrificed when the control tumors reach a size of approximately 1000 mm^3 on average.

The statistical evaluation is performed for the parameters tumor volume and body weight at the end of the experiment at day 21. For the tumor volume absolute values, and for the body weight the percentage of change refers to the initial weight of day 1 are used. Due to the observed variation, nonparametric methods are applied.

For descriptive considerations the number of observations, the median, the minimum and the maximum is calculated. For a quick overview of possible treatment effects, the median of the tumor volume of each treatment group T is referred to the median of the control C

- relative tumor volume (T/C)

$$T/C = 100 * \frac{T_d}{C_d}$$

- tumor growth inhibition (TGI) from day 1 until day *d*

$$TGI = 100 * \frac{(C_d - C_1) - (T_d - T_1)}{(C_d - C_1)}$$

where C_1, T_1 = median tumor volumes in control and treatment group at start of the experiment at day 1,

C_d, T_d = median tumor volumes in control and treatment group at end of the experiment at day *d*

A one-sided decreasing Wilcoxon test is applied to compare the dosage groups of the three VHHs with the control, looking for a reduction in tumor volume as effect and a reduction in the body weight gain as adverse event.

The p values for the tumor volume (efficacy parameter) are adjusted for multiple comparisons according to Bonferroni-Holm, whereas the p values of the body weight (tolerability parameter) remain unadjusted in order not to overlook a possible adverse effect.

The level of significance is fixed at α=5%. An (adjusted) p-value of less than 0.05 is considered to show a difference between treatment groups; differences are seen as indicative whenever 0.05 ≤ p-value < 0.10.

The statistical evaluation is prepared using the software package SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) and Proc StatXact (Cytel Software Corporation, Cambridge MA, USA).

As shown in Figure 52 and Table 75 and 76, VEGFDLLBII013, VEGFDLLBII010 and VEGFDLLBII015 show significant efficacy in the SW620 colon cancer model and are well tolerated.

Figure 52A shows the SW620 tumor growth kinetics: SW620 tumor-bearing mice are treated daily (open symbols) with VEGFDLLBII013 (VHH 1), VEGFDLLBII010 (VHH 2) or VEGFDLLBII015 (VHH 3) or every second day (closed symbols) with VEGFDLLBII013 (VHH 1) or VEGFDLLBII010 (VHH 2). Median tumor volumes are plotted over time. Day 1 is the first day, day 21 the last day of the experiment. The triangles on the top of the graph indicate the treatment days.

Figure 52B shows the absolute tumor volumes at the end of the study on day 21: SW620 tumor-bearing mice are treated daily (open symbols) with VEGFDLLBII013 (VHH 1), VEGFDLLBII010 (VHH 2) or VEGFDLLBII015 (VHH 3) or every second day (closed symbols) with VEGFDLLBII013 (VHH 1) or VEGFDLLBII010 (VHH 2). Individual absolute tumor volumes at day 21 are plotted. Each symbol represents an individual tumor. The horizontal lines represent the median tumor volumes.

Figure 52C shows the change of body weight over time; SW620 tumor-bearing mice are treated daily (open symbols) with VEGFDLLBII013 (VHH 1), VEGFDLLBII010 (VHH 2) or VEGFDLLBII015 (VHH 3) or every second day (closed symbols) with VEGFDLLBII013 (VHH 1) or VEGFDLLBII010 (VHH 2). Day 1 is the first day, day 21 the last day of treatment. The triangles on the top of the graph indicate the treatment days.

Table 75: Tumor volume: treatment vs. control (results on day 21)

Compound	Dose [mg/kg]	Schedule	TGI [%]	p value
Vehicle	-	qdx21	-	-
VEGFDLLBII013	7	qdx21	92.2	0.0004
	2.33	qdx21	87.6	0.0004
	14	q2dx11	93.1	0.0004
VEGFDLLBII010	4.05	qdx21	97.1	0.0004
	1.35	qdx21	93.4	0.0004
	8.1	q2dx11	94.9	0.0004
VEGFDLLBII015	8.43	qdx21	91.6	0.0004
	2.81	qdx21	90.1	0.0004

Table 76: Body weight: treatment vs. control (results on day 21)

Compound	Dose [mg/kg]	Schedule	Weight gain [%]	p value
Vehicle	-	qdx21	8.85	-
VEGFDLLBII013	7	qdx21	7.97	0.3177
	2.33	qdx21	8.63	0.3698
	14	q2dx11	8.15	0.2681
VEGFDLLBII010	4.05	qdx21	6.61	0.3004
	1.35	qdx21	9.05	0.4811
	8.1	q2dx11	9.50	0.5937
VEGFDLLBII015	8.43	qdx21	10.9	0.6655
	2.81	qdx21	6.56	0.6655

99

Example 18

Pharmacokinetics of formatted VHHs in mice

In order to determine the pharmacokinetics of selected VHHs in mice, a single dose of 33 nmol/kg in 0.1 mL is administered i.p. to six animals/group BomTac:NMRI-Foxn1nu female mice (6-7 weeks old). At different time points (3 mice per timepoint) approximately 50 µl blood is obtained by retroorbital bleeding under isoflurane anaesthesia. The samples are centrifuged after 30 min and the obtained 20µL serum are stored at -20 °C until analysis. VHH concentrations are measured by a sandwich ELISA.

Microtiter plates (Medisorp Nunc) are coated with 100 µl per well of human VEGF (R&D Systems 293-VE/CF) diluted to 0.5 µg/ml in carbonate buffer pH 9.6 over night at +4°C. After washing with 300 µl deionized water, residual binding sites are blocked by addition of 200 µl blocking buffer (PBS/0.5% bovine serum albumin/0.05 % Tween 20) for 0.5 hours.

After an additional washing step, 100 µl per well of dilutions of standards or samples in serum dilution medium (SDM, blocking buffer + 2 % mouse serum pool, PAA Labor GmbH) are added to the ELISA plates and incubated on a plate shaker for 1 hour at room temperature. For standard curve generation, VHHs are diluted to 100 (VEGFDLLBII013) or 10 (VEGFDLLBII010 and VEGFDLLBII015) ng/ml in serum dilution medium and added to the ELISA plates in 8 twofold dilutions in SDM in duplicates. Mouse serum samples are diluted a minimum of 1:50 in blocking buffer and further dilutions are made in SDM. Serum samples are added to the ELISA plates also in 8 twofold dilutions and duplicates.

Plates are washed once more and for detection of bound VHHs 100 µl per well of human Dll4-HIS (R&D Systems 1506-D4/CF) diluted to 0.2 µg/ml in blocking

buffer are added and incubated on the shaker for 1 hour as before. After washing the plates again 100 µl per well of anti-6XpolyHistidine-HRPO (R&D Systems MAB050H) diluted 1:5000 in blocking buffer are added and plates incubated for 1 hour as before. After a threefold final wash with 300 µl de-ionized water each, bound VHHs are detected by addition of 100 µl per well of TMB staining solution (Bender MedSystems BMS406.1000) and color development stopped after about 10 minutes incubation at room temperature on the shaker by addition of 100 µl per well of 1 M phosphoric acid. Optical densities of the individual wells are quantified using a microtiter plate spectrophotometer (ThermoMax, Molecular Devices) and the ELISA Software SoftMax Pro (Molecular Devices). Sample results are derived from standard curves fitted using a four parameter logistic curve fit.

Table 77:

	VHH serum concentration (nM)		
time (h)	VEGFDLLBII013	VEGFDLLBII010	VEGFDLLBII015
0,0833	2,49	4,85	0,88
0,5	69,8	60,5	40,7
1	230	264	113
4	376	335	308
24	151	184	160
72	15,2	48,7	26,8
168	< 0,86	0,88	1,71
240	< 0,78	< 0,14	< 0,21

Serum half lives of VHHs are determined to be 15h (VEGFDLLBII013), 17h (VEGFDLLBII010) and 24h (VEGFDLLBII015), respectively. (Half life determination is done by fitting the last 3 data points from the mean plasma concentration curves with WinNonLin V6 to an exponential slope.)

100

Claims

1. A bispecific binding molecule comprising a Dll4-binding component and a VEGF-binding component.
2. A bispecific binding molecule of claim 1, wherein said Dll4-binding component and said VEGF-binding component comprise at least one Dll4-binding immunoglobulin single variable domain and at least one VEGF-binding immunoglobulin single variable domain, respectively.
3. A bispecific binding molecule of claim 2, wherein said immunoglobulin single variable domains are VHHs.
4. A bispecific binding molecule of claim 2 or 3, wherein said VEGF-binding component is located N-terminally.
5. A bispecific binding molecule of any one of claims 2 to 4, wherein said Dll4-binding component and said VEGF-binding component comprise at least one VEGF-binding immunoglobulin single variable domain and at least one Dll4-binding immunoglobulin single variable domain, respectively, wherein each of said immunoglobulin single variable domains has four framework regions and three complementarity determining regions CDR1, CDR2 and CDR3, respectively, wherein
   a) a CDR3 of said at least one Dll4-binding immunoglobulin single variable domain has an amino acid sequence selected from
      i. Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Xaa Pro Tyr Xaa Tyr Asp Xaa as shown in SEQ ID NO: 1, wherein Xaa at position 8 is Arg, Ala or Glu;

Xaa at position 11 is Leu or Glu; and
Xaa at position 14 is Tyr or His; and

ii. Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala Tyr Xaa Asp Tyr as shown in SEQ ID NO: 2, wherein Xaa is Gln, Ala or Tyr; and wherein

b) a CDR3 of said at least one VEGF-binding immunoglobulin single variable domain has the amino acid sequence Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Xaa Tyr, as shown in SEQ ID NO: 3, wherein Xaa is Asp or Glu, wherein said VEGF-binding immunoglobulin single variable domain is capable of blocking the interaction of human recombinant VEGF165 with the human recombinant VEGFR-2 with an inhibition rate of ≥60%.

6. A bispecific binding molecule of claim 5, wherein said immunoglobulin single variable domain is a VHH that has been obtained by sequence optimization, optionally after affinity maturation, of a parent immunoglobulin single variable domain VHH.

7. A bispecific binding molecule of claim 6, wherein said Dll4-binding VHH has been obtained from a parent VHH with an amino acid sequence selected from sequences shown in SEQ ID NOs: 4 – 20 and in Table 5.

8. A bispecific binding molecule of claim 7, wherein said parent VHH has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10.

9. A bispecific binding molecule of claim 8, wherein said Dll4-binding VHH has been obtained by sequence optimization of an affinity-matured VHH derived from the VHH with the sequence shown in SEQ ID NO: 10, wherein said affinity-matured VHH is selected from VHHs having amino acid sequences shown in SEQ ID NOs: 21 – 27 and in Table 16.

10. A bispecific binding molecule of claim 9, wherein said affinity-matured VHH has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:22 and wherein said sequence-optimized VHH has an amino acid sequence selected from sequences shown in SEQ ID NOs: 34 and 35 and in Table 23.

11. A bispecific binding molecule of claim 7, wherein said parent VHH has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12.

12. A bispecific binding molecule of claim 11, wherein said Dll4-binding VHH has been obtained by sequence optimization of an affinity-matured VHH derived from the VHH with the sequence shown SEQ ID NO: 12, wherein said affinity-matured VHH is selected from VHHs having amino acid sequences shown in in SEQ ID NOs: 28 – 33 and in Table 17.

13. A bispecific binding molecule of claim 12, wherein said affinity-matured VHH has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 32 and wherein said sequence-optimized VHH has an amino acid sequence selected from sequences shown in SEQ ID NOs: 40 and 41.

14. A bispecific binding molecule of claim 6, wherein said VEGF-binding is a VHH that is derived from a VHH having a sequence selected from sequences shown in SEQ ID NOs: 42 – 44 and Table 32.

15. A bispecific binding molecule of claim 14, wherein said VEGF-binding VHH has been obtained by sequence optimization of a VHH with an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 43.

16. A bispecific binding molecule of claim 15, wherein said sequence-optimized VHH has an amino acid sequence selected from sequences shown in SEQ ID NOs: 63 and 64 and Table 59.

17. A bispecific binding molecule of claim 3, wherein the VEGF-binding component is a biparatopic VHH, wherein the VHHs forming the building blocks of said biparatopic VHH bind to non-overlapping epitopes.

18. A bispecific binding molecule of claim 17, wherein at least one VHH is capable of blocking the interaction between recombinant human VEGF and the recombinant human VEGFR-2 with an inhibition rate of ≥ 60% and wherein at least one VHH is capable of blocking said interaction with an inhibition rate of ≤ 60 %.

19. A bispecific binding molecule of claim 18, which said VHH with an inhibition rate of ≤ 60 % is a sequence-optimized variant of a VHH with a sequence shown in SEQ ID NO: 45.

20. A bispecific binding molecule of claim 19, wherein said VHH has a sequences shown in SEQ ID Nos: 65 and 66 and in Table or a sequence shown in SEQ ID NO: 67 (Table 63).

21. A bispecific binding molecule of claim 5 comprising

a) as the Dll4-binding component a VHH with a sequence selected from sequences in SEQ ID NO: 35 or 41, and

b) as the VEGF-binding component

i. a VHH with a sequence shown in SEQ ID NO: 64 or

ii. a biparatopic VHH comprising a VHH with a sequence shown in SEQ ID NO: 64 and a VHH with a sequence shown in SEQ ID NO: 67.

22. A bispecific binding molecule of any one of claims 1 to 21, comprising one or more linker molecules and/or half-life-extending moieties.

23. A bispecific binding molecule of claim 22, wherein said half-life extending moiety is covalently linked to or fused to an immunoglobulin single variable domain and is selected from an Fc portion, an albumin, an albumin binding immunoglobulin single variable domain, or a polyoxyalkylene molecule.

24. A bispecific binding molecule of claim 21 and 22, which has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 81.

25. A bispecific binding molecule of claim 21 and 22, which has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 82.

26. A bispecific binding molecule of claim 21 and 22, which has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 83.

27. A bispecific binding molecule of claim 21, which has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 84.

28. A bispecific binding molecule of claim 21 and 22, which has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 85.

29. A bispecific binding molecule of claim 21 and 22, which has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 86.

30. A nucleic acid molecule encoding a bispecific binding molecule of any one of claims 1 to 29 or a vector containing same.

31. A host cell containing a nucleic acid molecule of claim 30.

32. A pharmaceutical composition containing at least one VEGF-binding molecule of any one of claims 1 to 29 as the active ingredient.

33. The pharmaceutical composition of claim 32 for the treatment of a disease that is associated with VEGF-mediated effects on angiogenesis.

34. The pharmaceutical composition of claim 32 for the treatment of cancer and cancerous diseases.

35. The pharmaceutical composition of claim 32 for the treatment of eye diseases.

Fig. 1

```
                    1                                                   100
DLL4 human      (1) MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGR
DLL4 rhesus     (1) MAAASWSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFVNERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGSVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGR
  DLL4 cyno     (1) MAAASWSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFVNERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGSVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGR

                  101                                                   200
DLL4 human    (101) NPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVC
DLL4 rhesus   (101) NPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVC
  DLL4 cyno   (101) NPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVC

                  201                                                   300
DLL4 human    (201) QPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
DLL4 rhesus   (201) QPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
  DLL4 cyno   (201) QPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC

                  301                                                   400
DLL4 human    (301) SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCE
DLL4 rhesus   (301) SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGASYACECPPNFTGSNCE
  DLL4 cyno   (301) SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGASYACECPPNFTGSNCE

                  401                                                   500
DLL4 human    (401) KKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLS
DLL4 rhesus   (401) KKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCERHVSDCARNPCAHGGTCHDLESGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLS
  DLL4 cyno   (401) KKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCERHVSDCARNPCAHGGTCHDLESGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLS

                  501                                                   600
DLL4 human    (501) TDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL
DLL4 rhesus   (501) TDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL
  DLL4 cyno   (501) TDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL

                  601                                                   685
DLL4 human    (601) DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
DLL4 rhesus   (601) DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
  DLL4 cyno   (601) DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
```

103

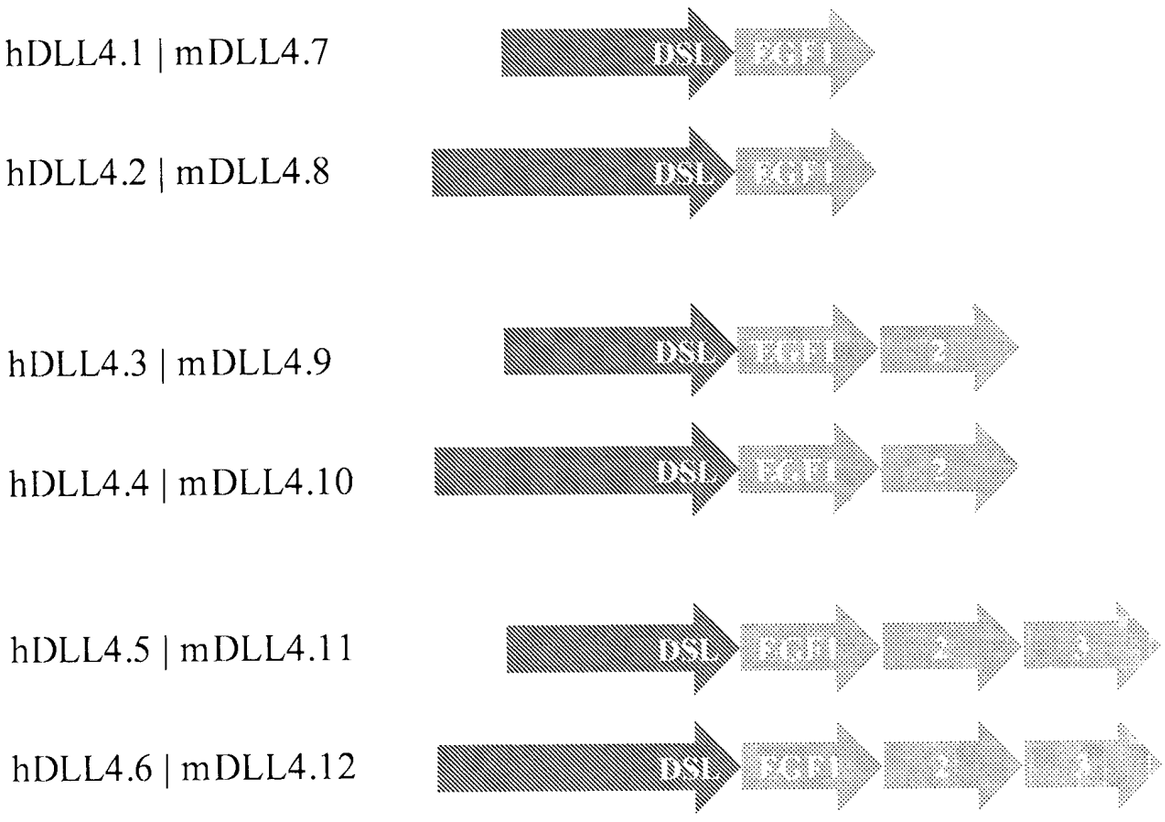
2 / 129
Fig. 2

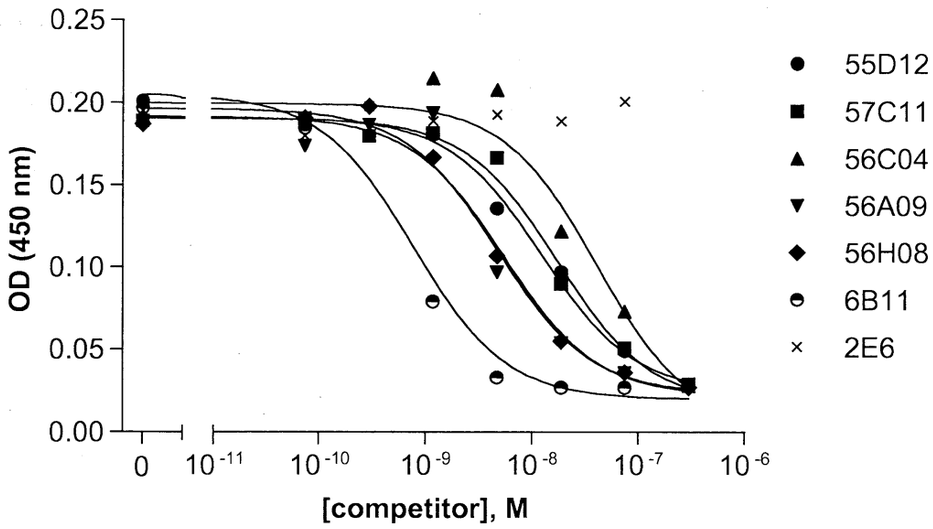
hDLL4 constructs

hDLL4.1: $DSL^{173-217}$ – $EGF1^{218-251}$ – (His)6
hDLL4.2: $DSL^{155-217}$ – $EGF1^{218-251}$ – (His)6
hDLL4.3: $DSL^{173-217}$ – $EGF1^{218-251}$ – $EGF2^{252-282}$ – (His)6
hDLL4.4: $DSL^{155-217}$ – $EGF1^{218-251}$ – $EGF2^{252-282}$ – (His)6
hDLL4.5: $DSL^{173-217}$ – $EGF1^{218-251}$ – $EGF2^{252-282}$ – $EGF3^{284-322}$ – (His)6
hDLL4.6: $DSL^{155-217}$ – $EGF1^{218-251}$ – $EGF2^{252-282}$ – $EGF3^{284-322}$ – (His)6

mDLL4 constructs

mDLL4.7: $DSL^{174-218}$ – $EGF1^{219-252}$ – (His)6
mDLL4.8: $DSL^{156-218}$ – $EGF1^{219-252}$ – (His)6
mDLL4.9: $DSL^{174-218}$ – $EGF1^{219-252}$ – $EGF2^{252-282}$ – (His)6
mDLL4.10: $DSL^{156-218}$ – $EGF1^{219-252}$ – $EGF2^{252-282}$ – (His)6
mDLL4.11: $DSL^{174-218}$ – $EGF1^{219-252}$ – $EGF2^{252-282}$ – $EGF3^{285-323}$ – (His)6
mDLL4.12: $DSL^{156-218}$ – $EGF1^{219-252}$ – $EGF2^{252-282}$ – $EGF3^{285-323}$ – (His)6




0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
OD (450 nm)
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M
55D12
57C11
56C04
56A09
56H08
6B11
2E6

104

Fig. 3-2

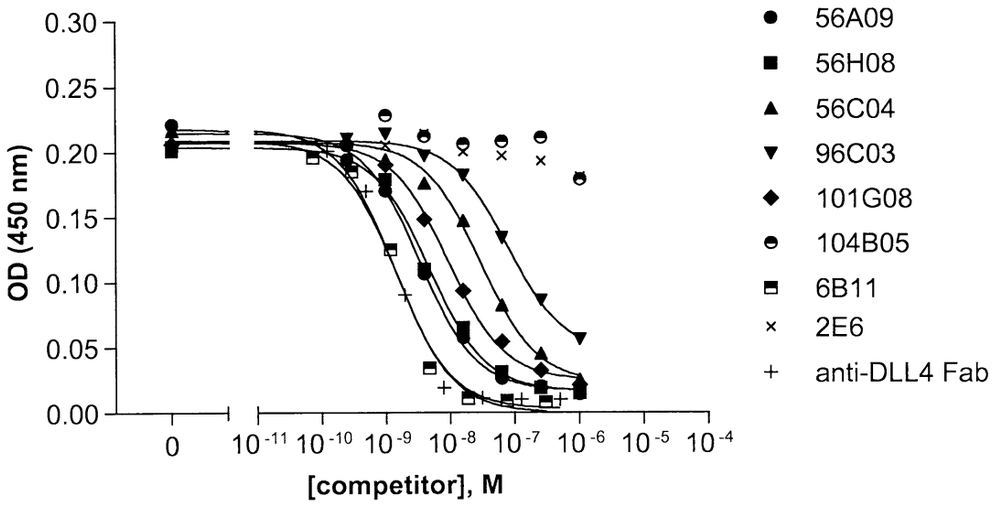
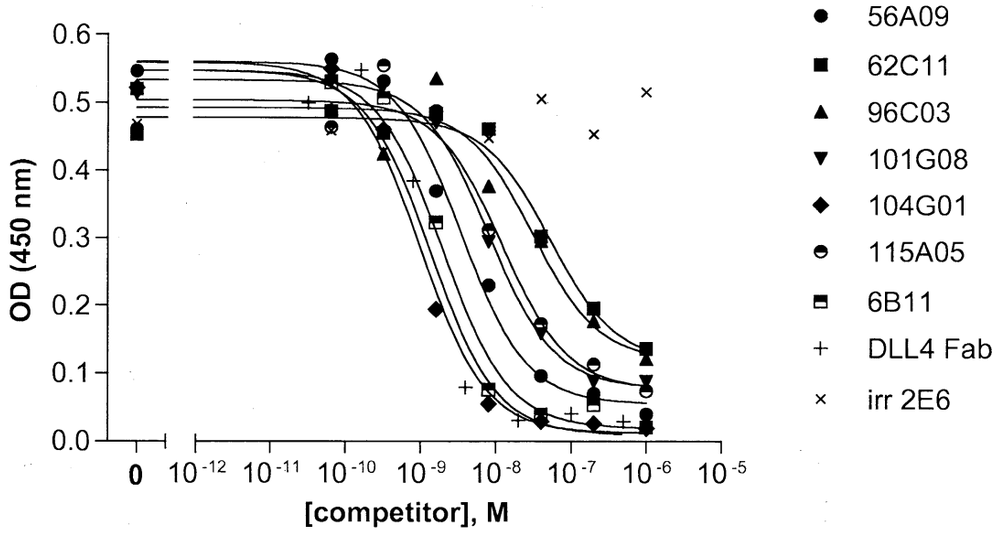
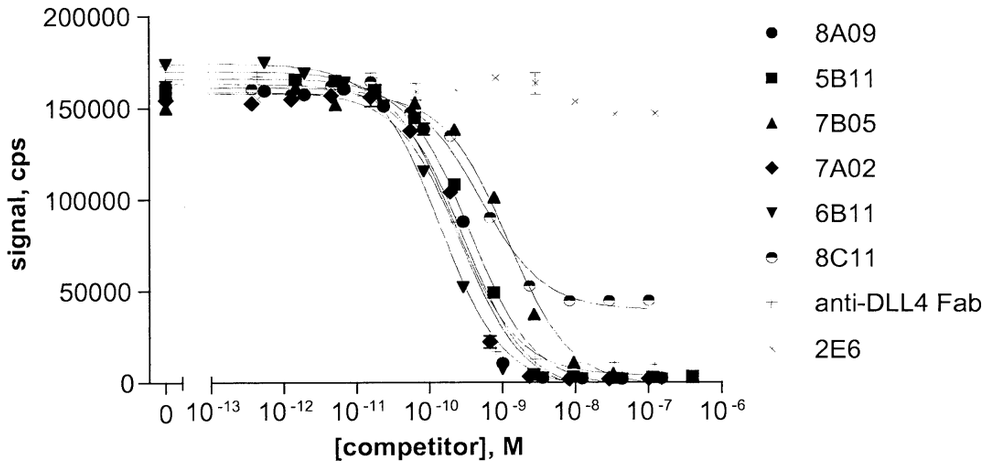
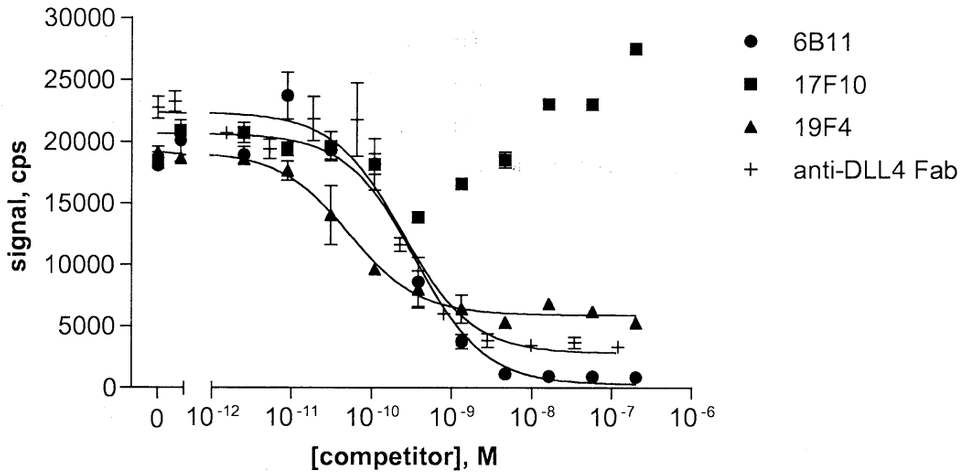

0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
OD (450 nm)
0
10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5 10-4
[competitor], M
56A09
56H08
56C04
96C03
101G08
104B05
6B11
2E6
anti-DLL4 Fab

Fig. 3-3


OD (450 nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competitor], M
56A09
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05
6B11
DLL4 Fab
irr 2E6

105


200000
150000
100000
50000
0
signal, cps
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competitor], M
8A09
5B11
7B05
7A02
6B11
8C11
anti-DLL4 Fab
2E6


30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
signal, cps
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M
6B11
17F10
19F4
anti-DLL4 Fab

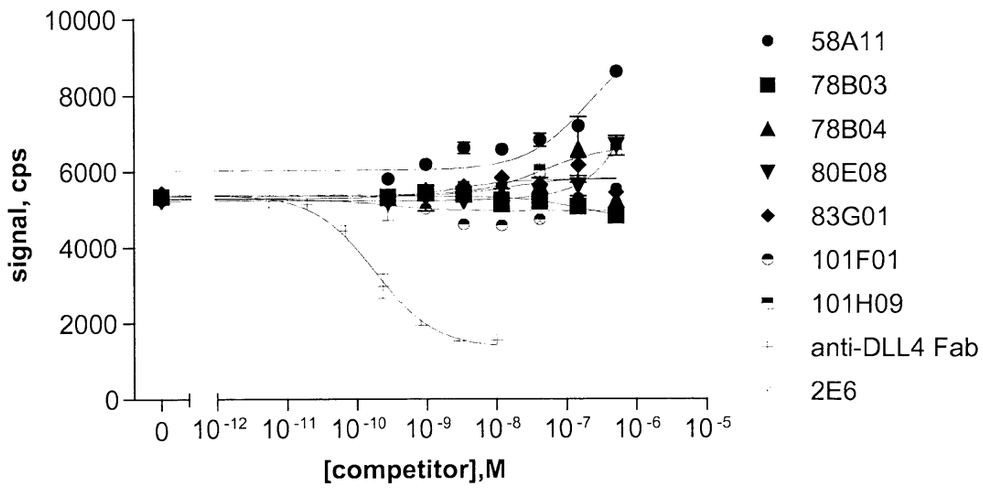
(06

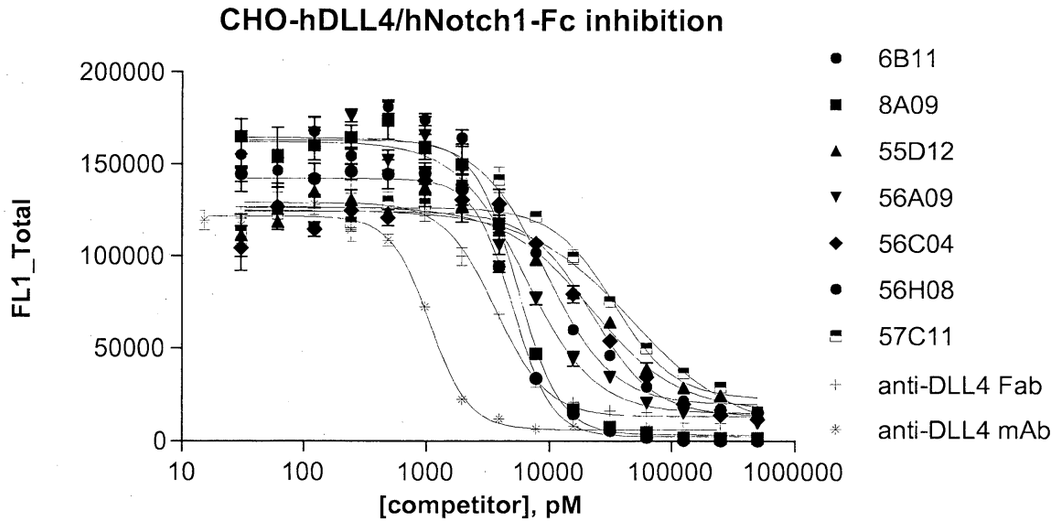
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
signal, cps
0
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-DLL4 Fab
8D09

Fig. 4-4

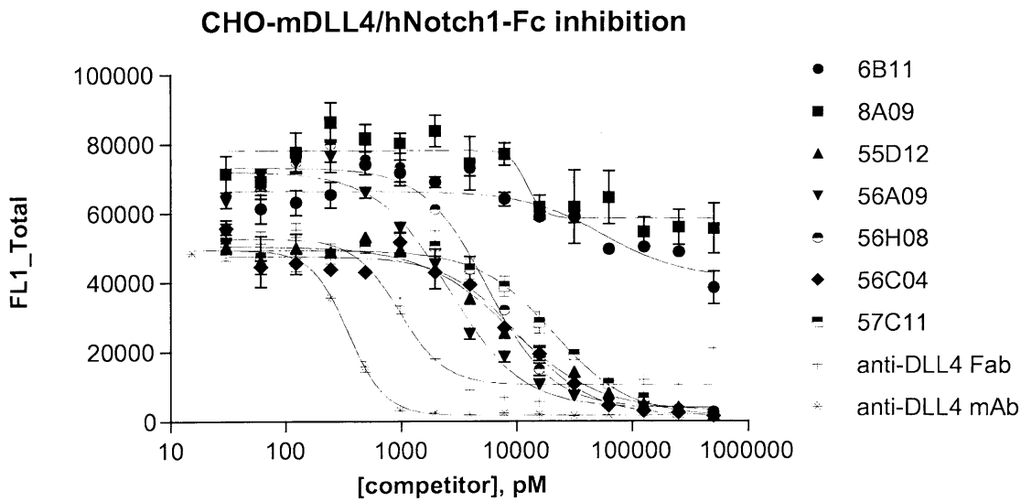
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
signal, cps
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competitor],M
61F05
61F07
62C11
83G04
95F02
102G04
115A05
anti-DLL4 Fab
irr 2E6

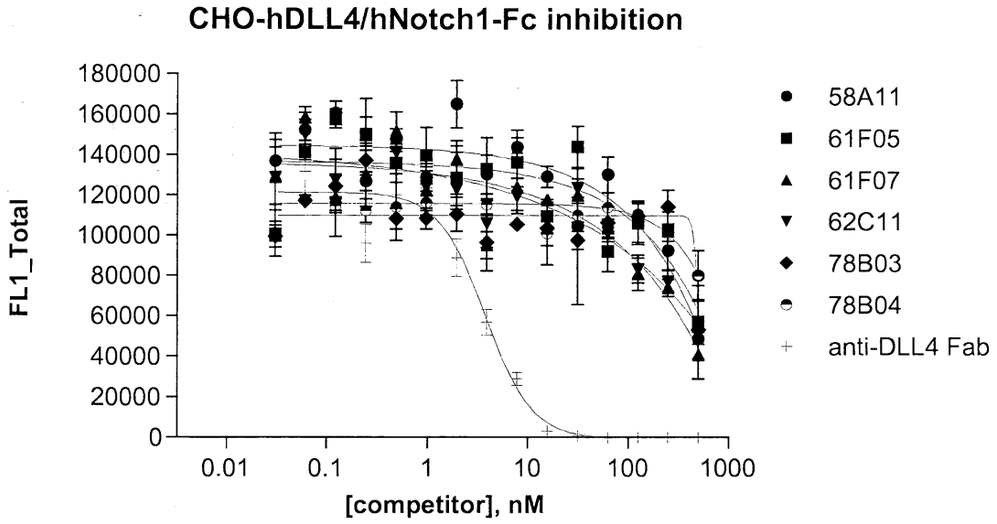
109


10000
8000
6000
4000
2000
0
signal, cps
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competitor],M
58A11
78B03
78B04
80E08
83G01
101F01
101H09
anti-DLL4 Fab
2E6


CHO-hDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
200000
150000
100000
50000
0
10
100
1000
10000
100000
1000000
[competitor], pM
6B11
8A09
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-DLL4 Fab
anti-DLL4 mAb

108


CHO-mDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
100000
80000
60000
40000
20000
0
10
100
1000
10000
100000
1000000
[competitor], pM
6B11
8A09
55D12
56A09
56H08
56C04
57C11
anti-DLL4 Fab
anti-DLL4 mAb


CHO-hDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
58A11
61F05
61F07
62C11
78B03
78B04
anti-DLL4 Fab

109

Fig. 5-4

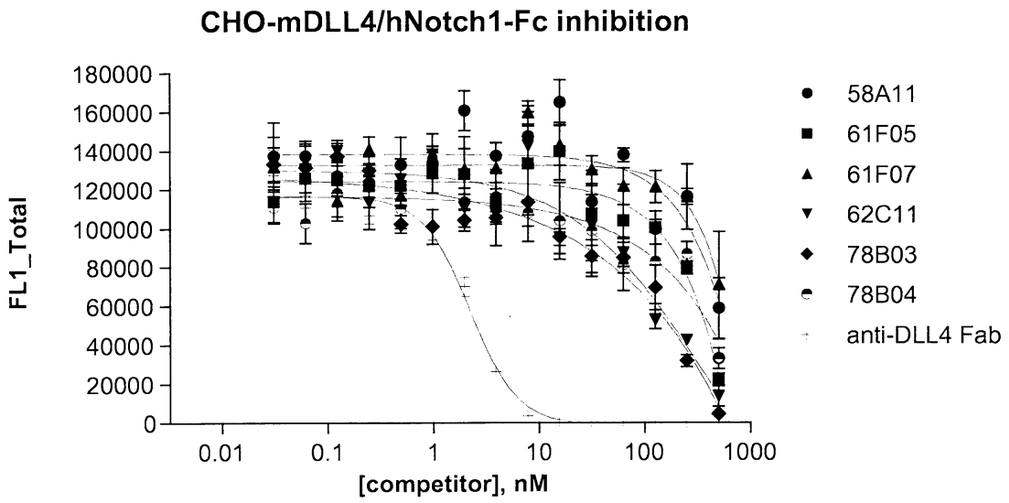

CHO-mDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
58A11
61F05
61F07
62C11
78B03
78B04
anti-DLL4 Fab

Fig. 5-5

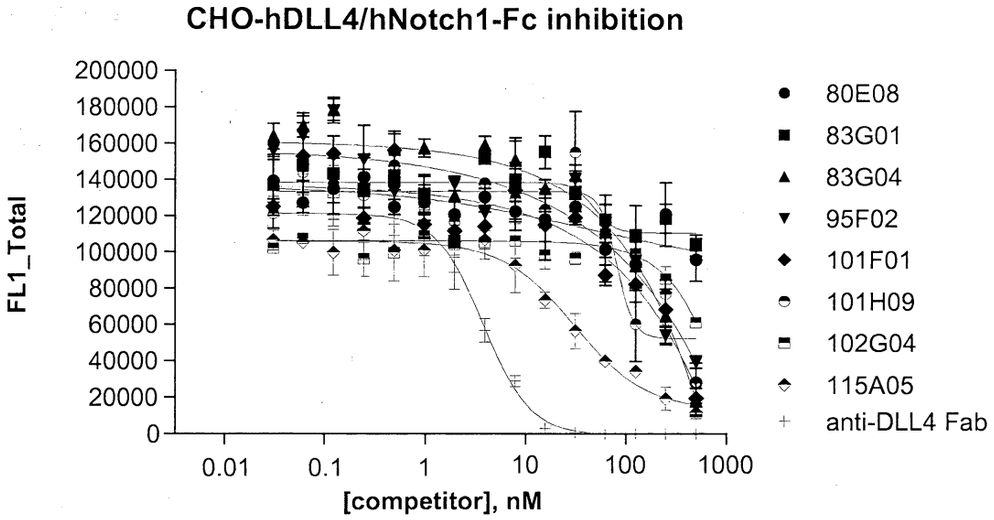
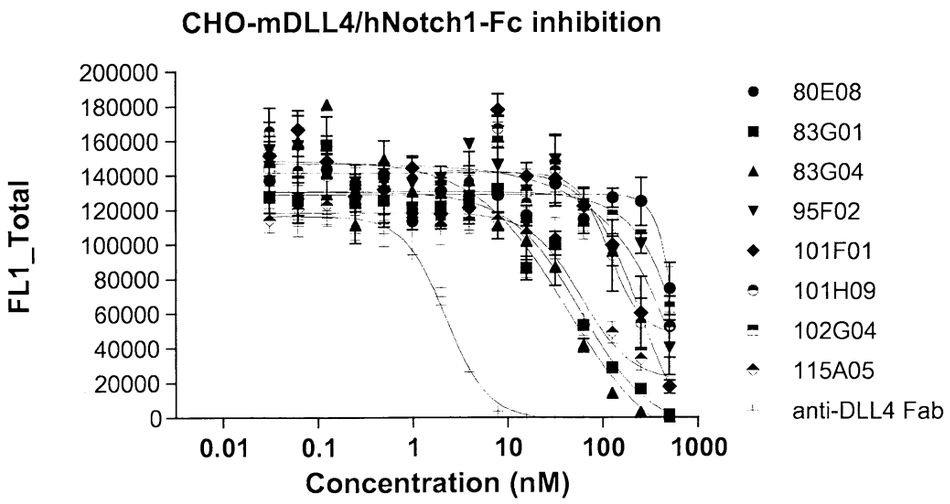

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
80E08
83G01
83G04
95F02
101F01
101H09
102G04
115A05
anti-DLL4 Fab

Fig. 5-6


CHO-mDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration (nM)
80E08
83G01
83G04
95F02
101F01
101H09
102G04
115A05
anti-DLL4 Fab

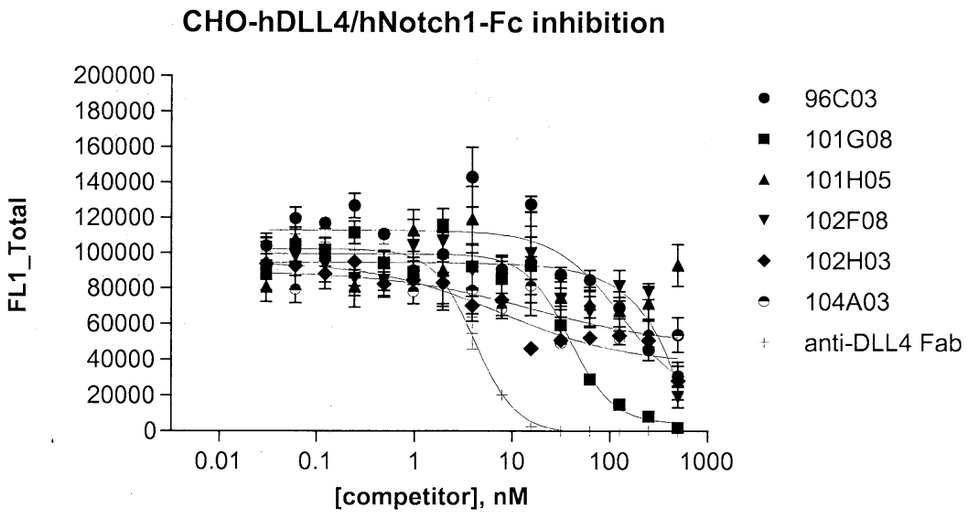

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
96C03
101G08
101H05
102F08
102H03
104A03
anti-DLL4 Fab

Fig. 5-8

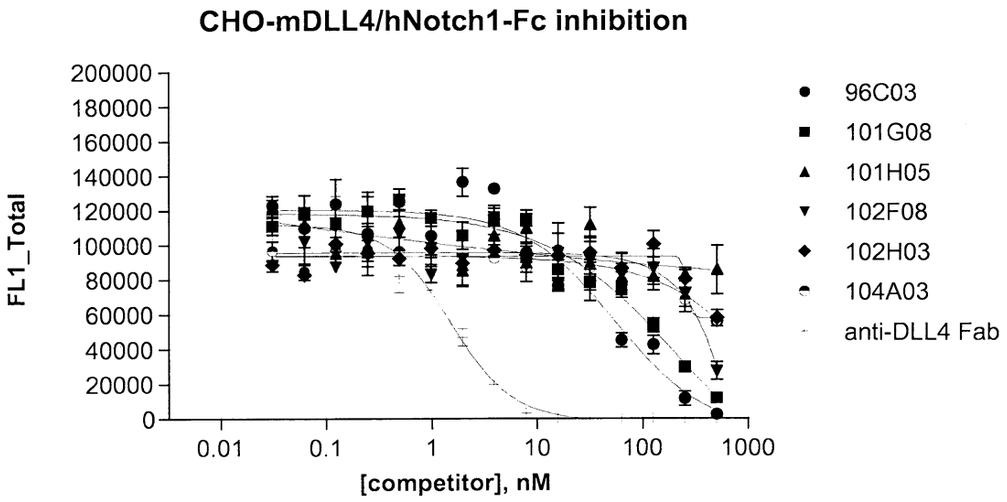
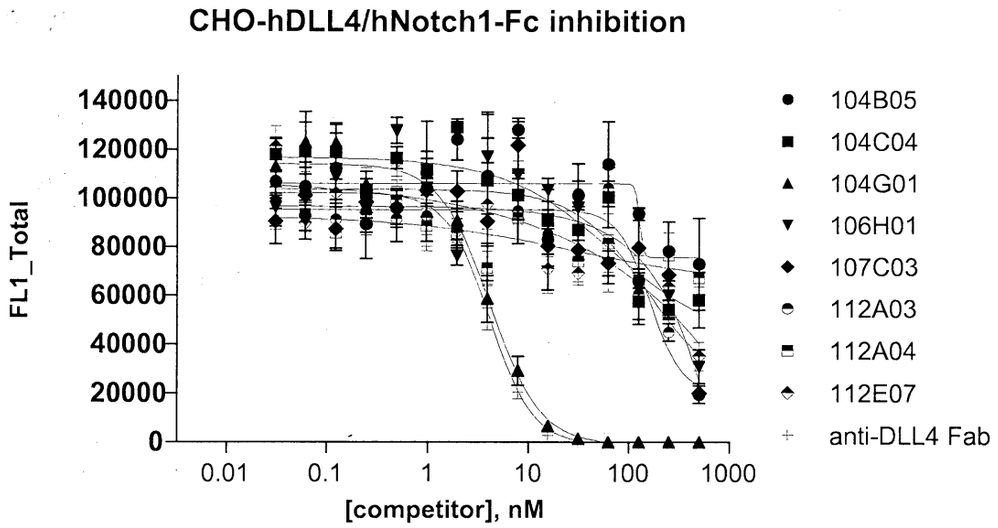
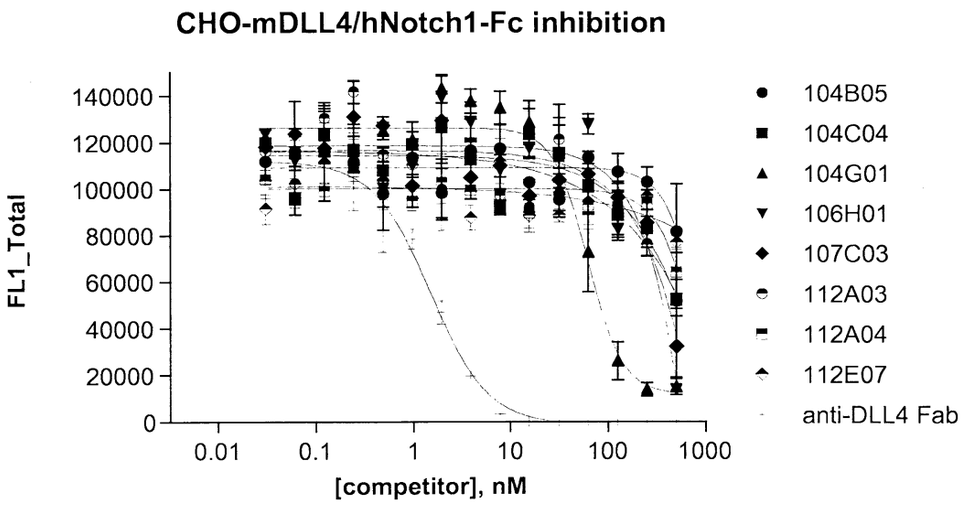

CHO-mDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
96C03
101G08
101H05
102F08
102H03
104A03
anti-DLL4 Fab

Fig. 5-9


CHO-hDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
104B05
104C04
104G01
106H01
107C03
112A03
112A04
112E07
anti-DLL4 Fab

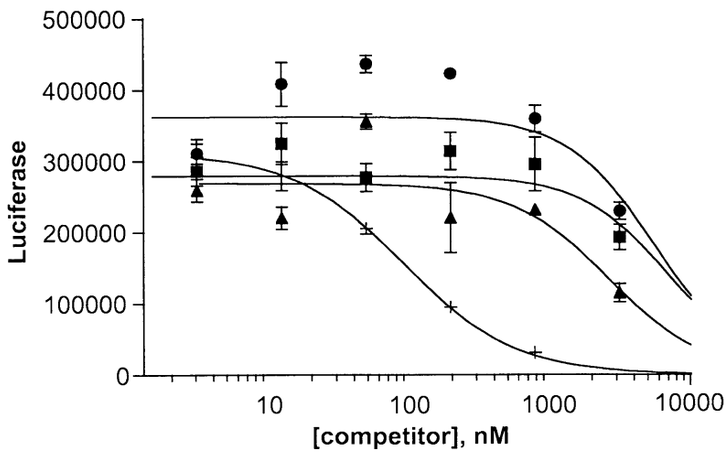
(12


CHO-mDLL4/hNotch1-Fc inhibition
FL1_Total
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
104B05
104C04
104G01
106H01
107C03
112A03
112A04
112E07
anti-DLL4 Fab

400000
300000
200000
100000
0
Luciferase
10
100
1000
10000
5
[competitor], nM
56A09
101G08
104G01
anti-DLL4 Fab

113

Fig. 6-2


500000
400000
300000
200000
100000
0
Luciferase
10
100
1000
10000
[competitor], nM
96C03
115A05
62C11
anti-DLL4 Fab

500000
400000
300000
200000
100000
0
Luciferase
0
10
100
1000
10000
[competitor], nM
56A9
101G08
anti-DLL4 Fab

114

Fig. 6-4

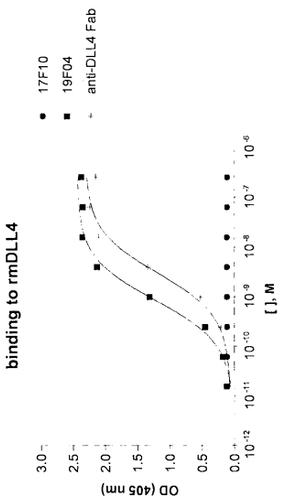
Luciferase
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
10
100
1000
10000
[competitor], nM
62C11
96C03
115A05
104G01
anti-DLL4 Fab

Fig. 7-1

binding to rhDLL4
OD (405 nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10 -12
10 -11
10 -10
10 -9
10 -8
10 -7
10 -6
[ ], M
7A02
7B05
8C11
8A09
5B11
6B11
anti-DLL4 Fab

binding to rmDLL4
OD (405 nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10 -12
10 -11
10 -10
10 -9
10 -8
10 -7
10 -6
[ ], M
7A02
7B05
8C11
8A09
5B11
6B11
anti-DLL4 Fab

Fig. 7-2


binding to rmDLL4
17F10
19F04
anti-DLL4 Fab
OD (405 nm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^-12
10^-11
10^-10
10^-9
10^-8
10^-7
10^-6
[ ], M

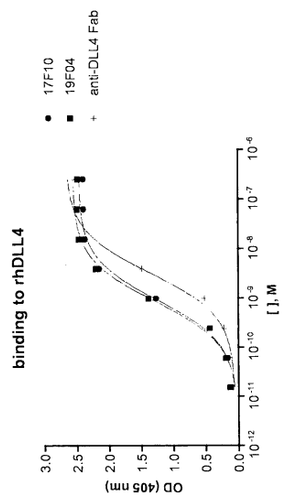

binding to rhDLL4
17F10
19F04
anti-DLL4 Fab
OD (405 nm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^-12
10^-11
10^-10
10^-9
10^-8
10^-7
10^-6
[ ], M

Fig. 7-3

binding to rhDLL4
OD (405 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-DLL4 Fab

binding to rmDLL4
OD (405 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-DLL4 Fab

16

Fig. 7-4

binding to rhDLL4
OD (405 nm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05
56A09
6B11
anti-DLL4 Fab
irr 2E6

binding to rmDLL4
OD (405 nm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05
56A09
6B11
anti-DLL4 Fab
irr 2E6

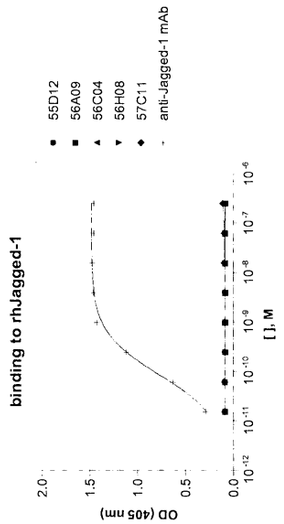
Fig. 8-1

binding to rhDLL1
OD (405 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[ ], M
7A02
7B05
8C11
8A09
5B11
6B11
anti-DLL1 pAb

binding to rhJagged-1
OD (405 nm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[ ], M
7A2
7B5
8C11
8A9
5B11
6B11
anti-Jagged-1 mAb

117

Fig. 8-2


binding to rhJagged-1
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-Jagged-1 mAb
OD (405 nm)
[ ], M

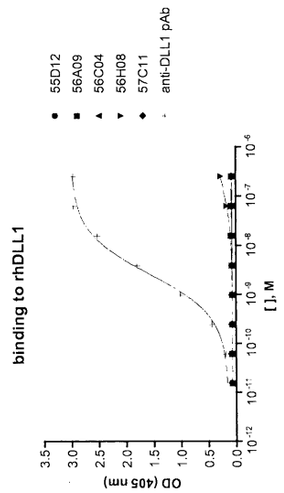

binding to rhDLL1
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-DLL1 pAb
OD (405 nm)
[ ], M

Fig. 8-3

binding to rhDLL1
OD (405 nm)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05
56A09
anti-DLL1 pAb
irr 2E6

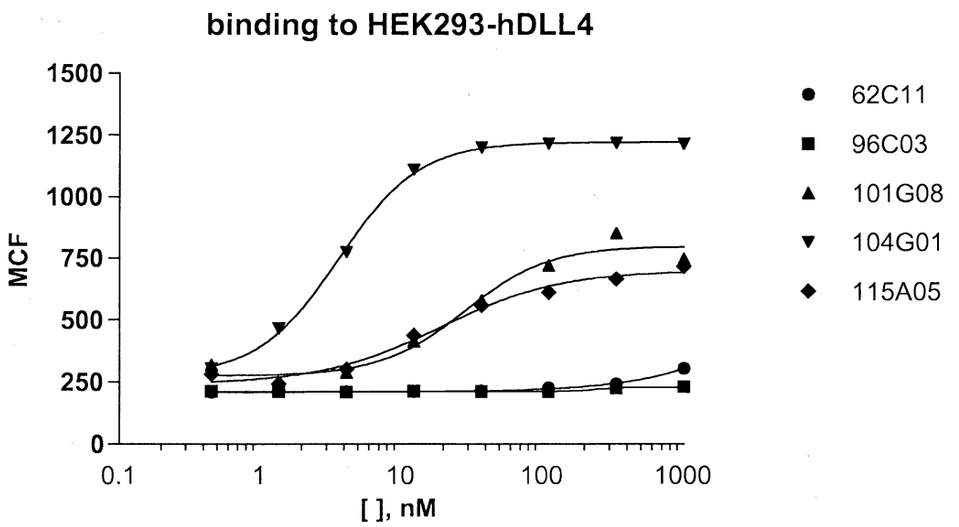
binding to rhJagged-1
OD (405 nm)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05
56A09
anti-Jagged-1 mAb
irr 2E6

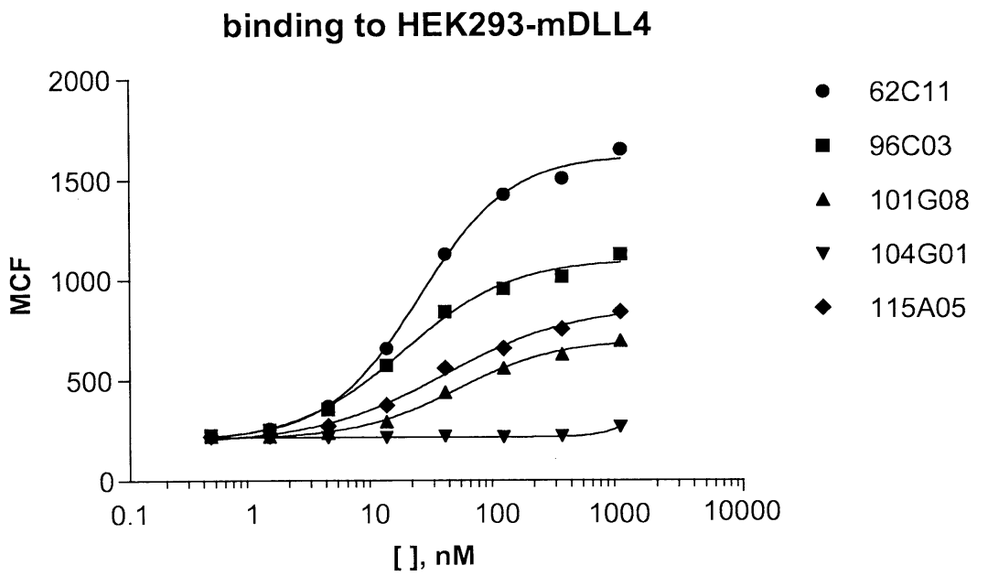
Fig. 9-1

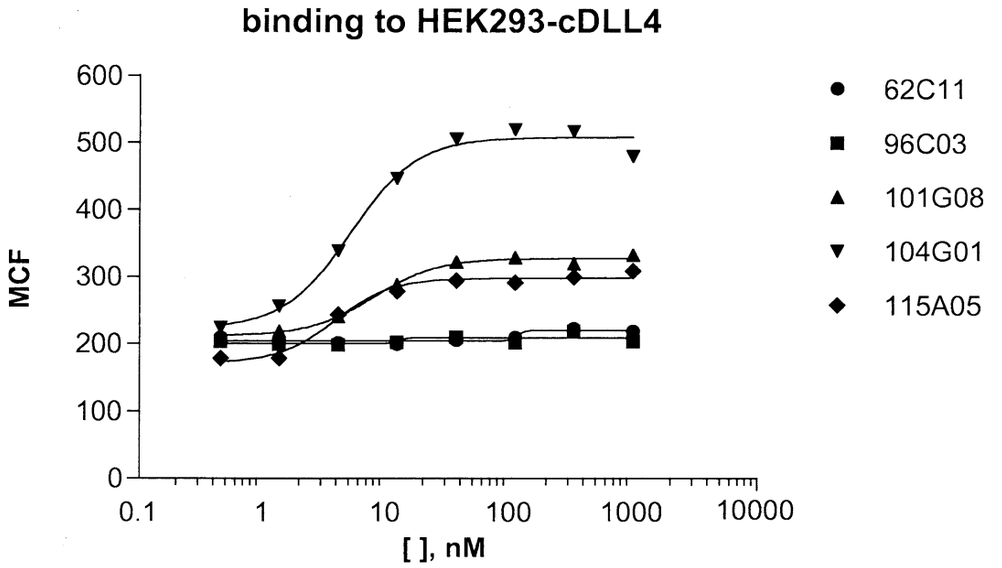
binding to HEK293-hDLL4
MCF
200000
150000
100000
50000
0
0.01
1
100
[ ], nM
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-DLL4 Fab

binding to HEK293-cDLL4
MCF
200000
150000
100000
50000
0
0.01
1
100
[ ], nM
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
anti-DLL4 Fab

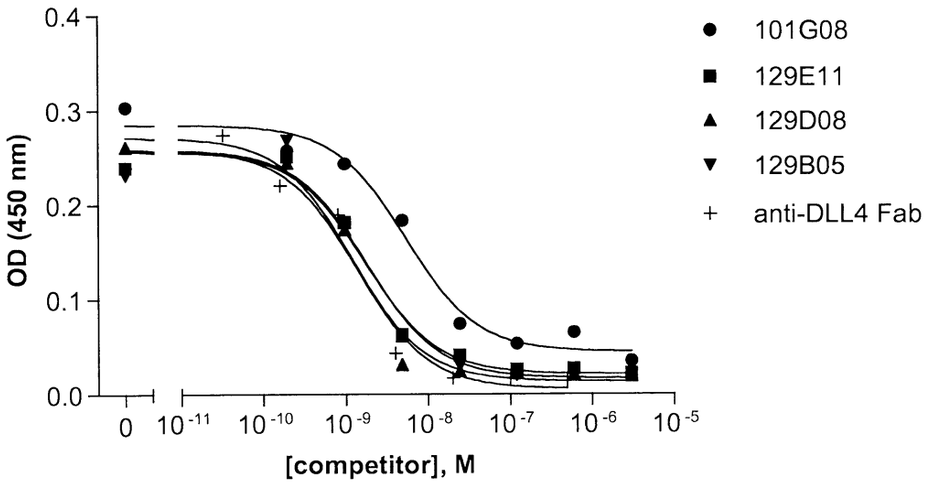
Fig. 9-2


binding to HEK293-hDLL4
MCF
1500
1250
1000
750
500
250
0
0.1
1
10
100
1000
[ ], nM
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05

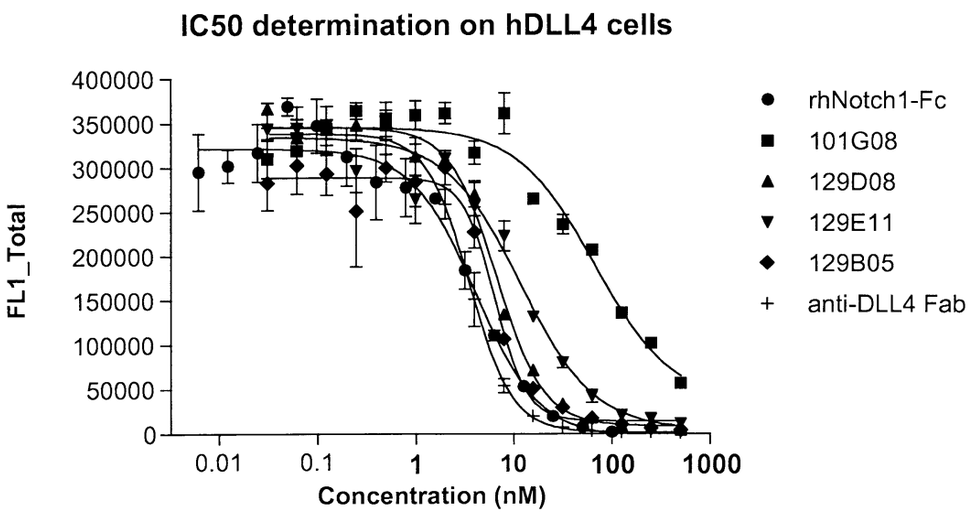

binding to HEK293-mDLL4
MCF
2000
1500
1000
500
0
0.1
1
10
100
1000
10000
[ ], nM
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05


binding to HEK293-cDLL4
MCF
600
500
400
300
200
100
0
0.1
1
10
100
1000
10000
[ ], nM
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05

120


0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
OD (450 nm)
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competitor], M
101G08
129E11
129D08
129B05
anti-DLL4 Fab

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
OD (450 nm)
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5 10-4
[competitor], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
anti-DLL4 Fab
2E6


IC50 determination on hDLL4 cells
FL1_Total
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration (nM)
rhNotch1-Fc
101G08
129D08
129E11
129B05
anti-DLL4 Fab

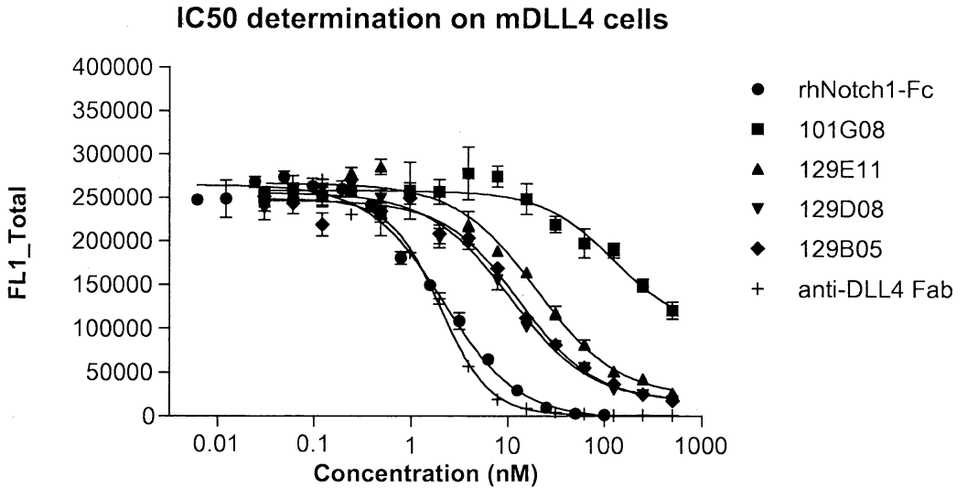
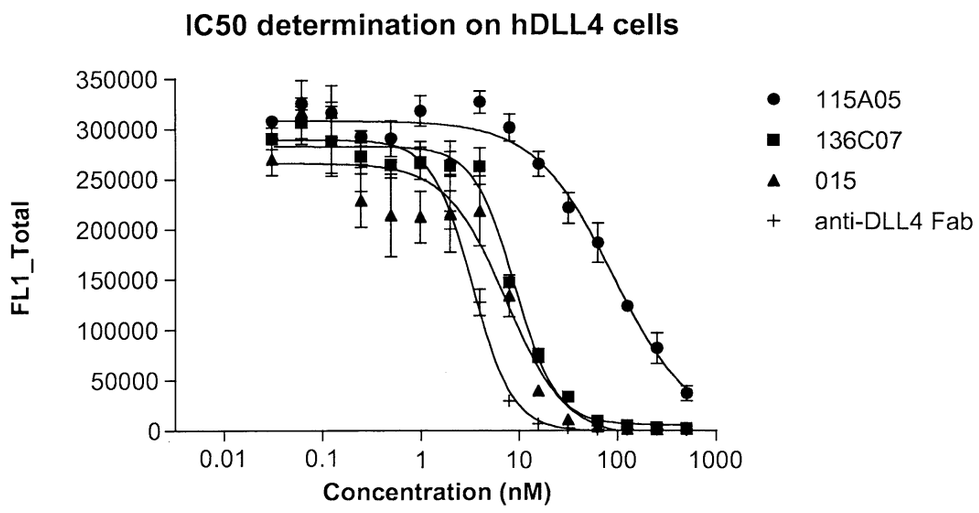
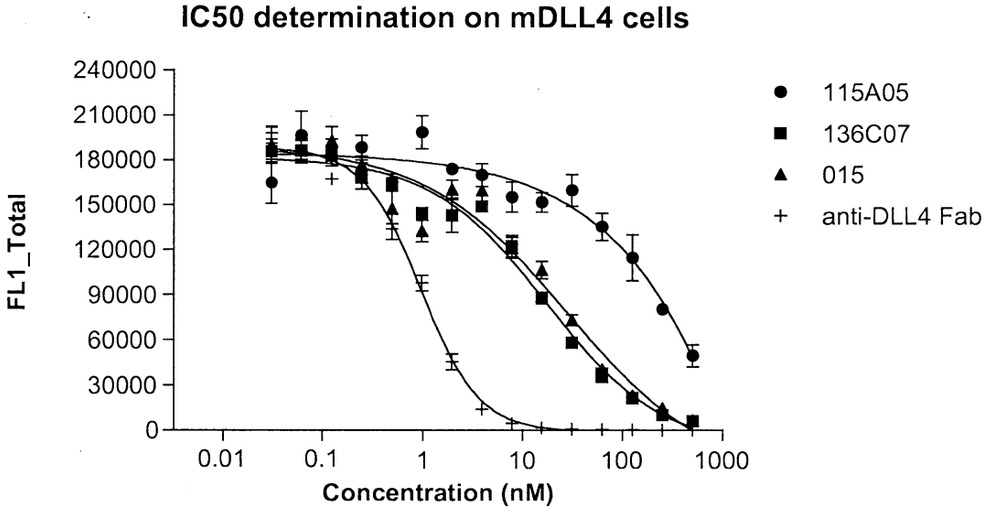
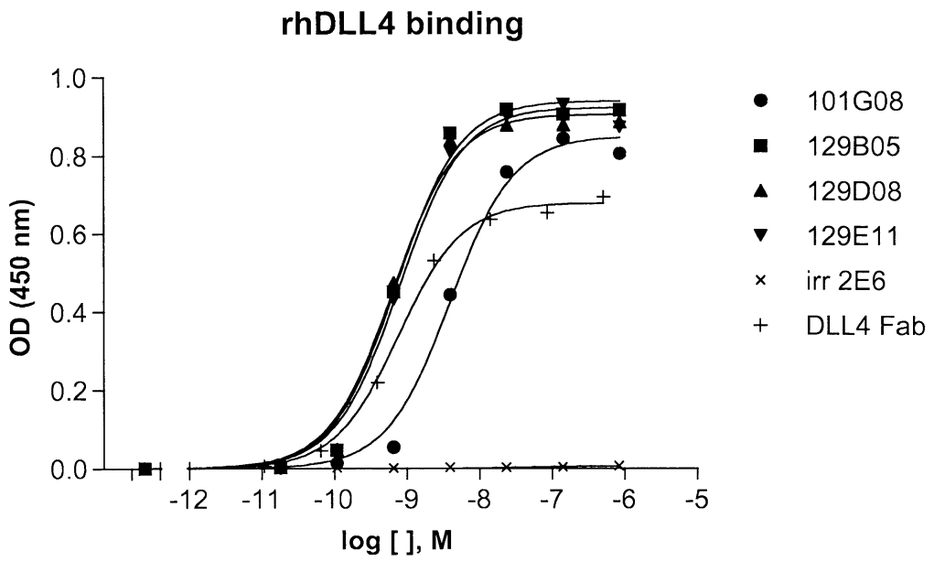
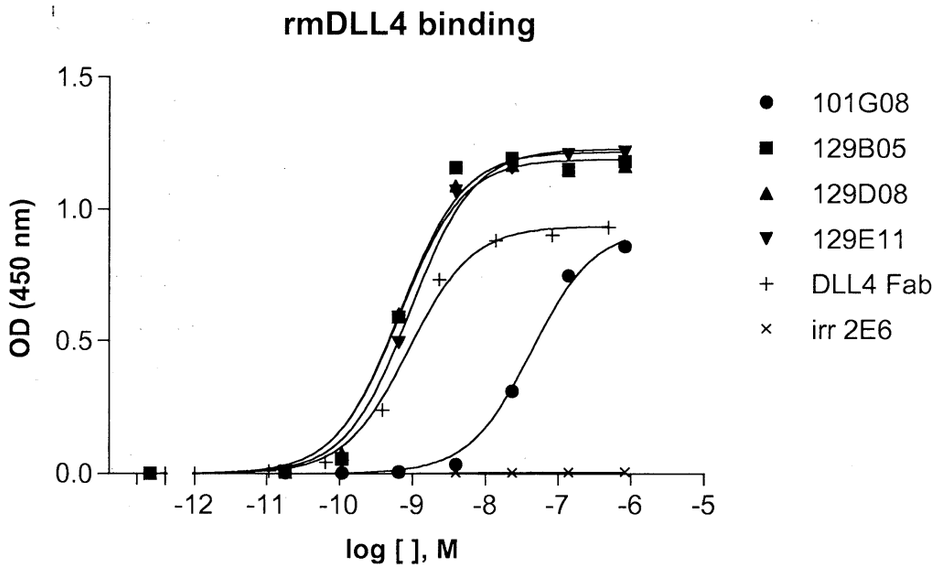

IC50 determination on mDLL4 cells
FL1_Total
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration (nM)
rhNotch1-Fc
101G08
129E11
129D08
129B05
anti-DLL4 Fab

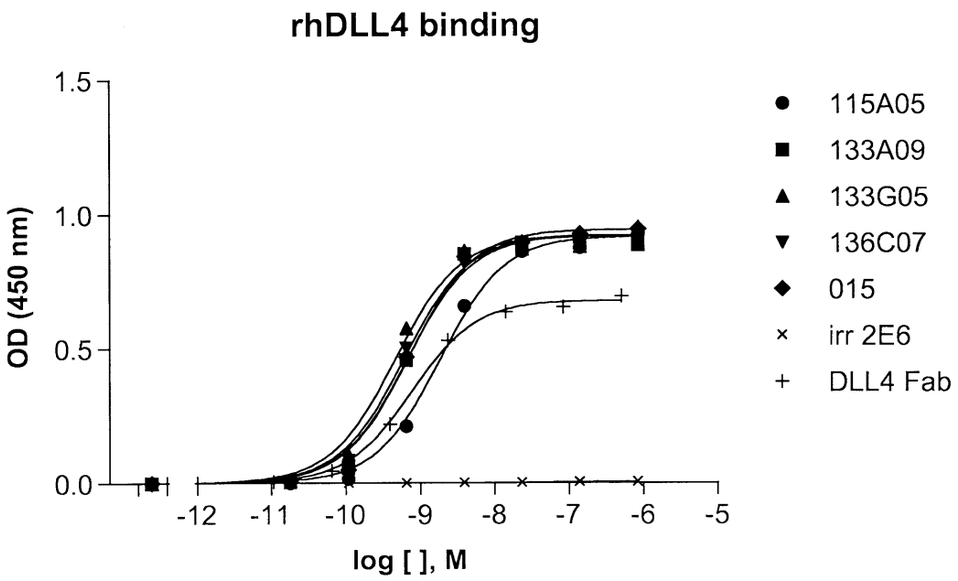
Fig. 11-3


IC50 determination on hDLL4 cells
FL1_Total
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration (nM)
115A05
136C07
015
anti-DLL4 Fab

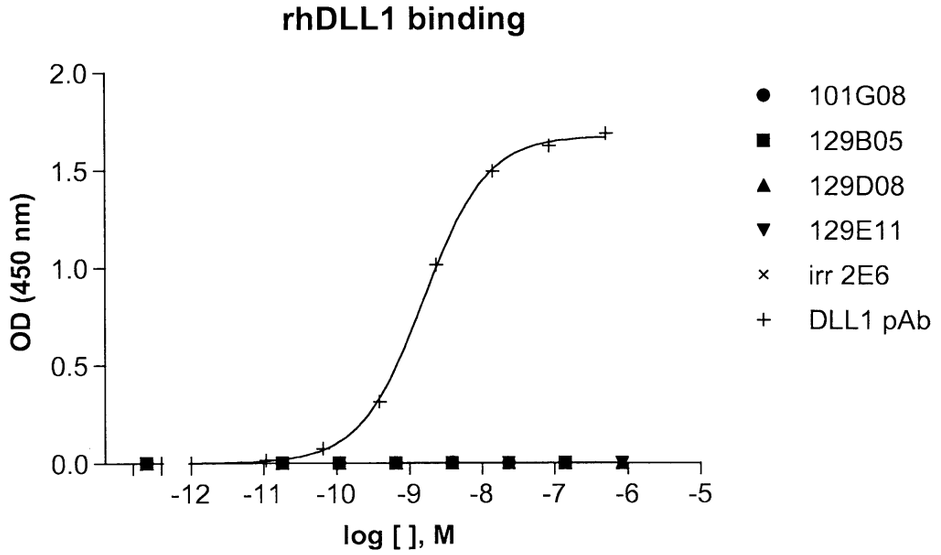

IC50 determination on mDLL4 cells
FL1_Total
240000
210000
180000
150000
120000
90000
60000
30000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration (nM)
115A05
136C07
015
anti-DLL4 Fab

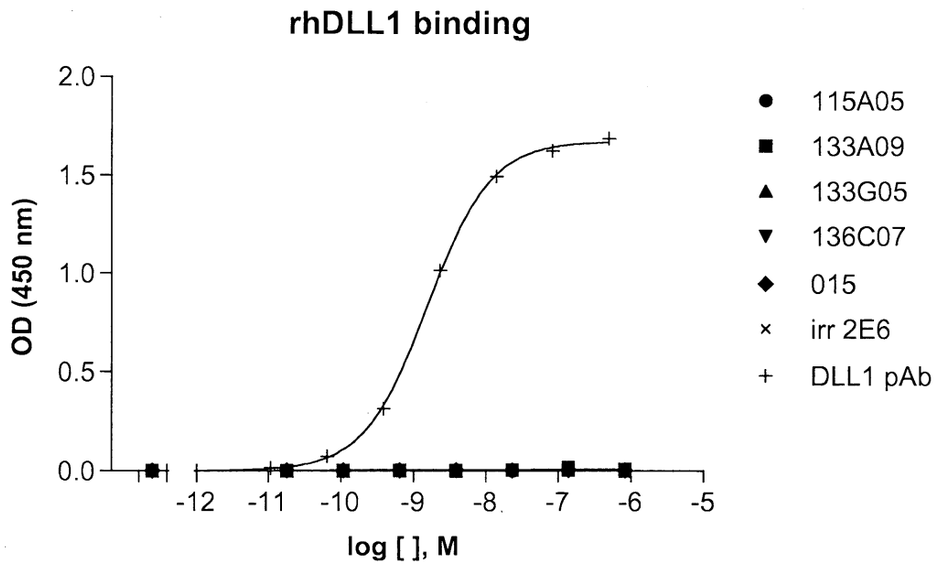

rhDLL4 binding
OD (450 nm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
irr 2E6
DLL4 Fab


rmDLL4 binding
OD (450 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
DLL4 Fab
irr 2E6

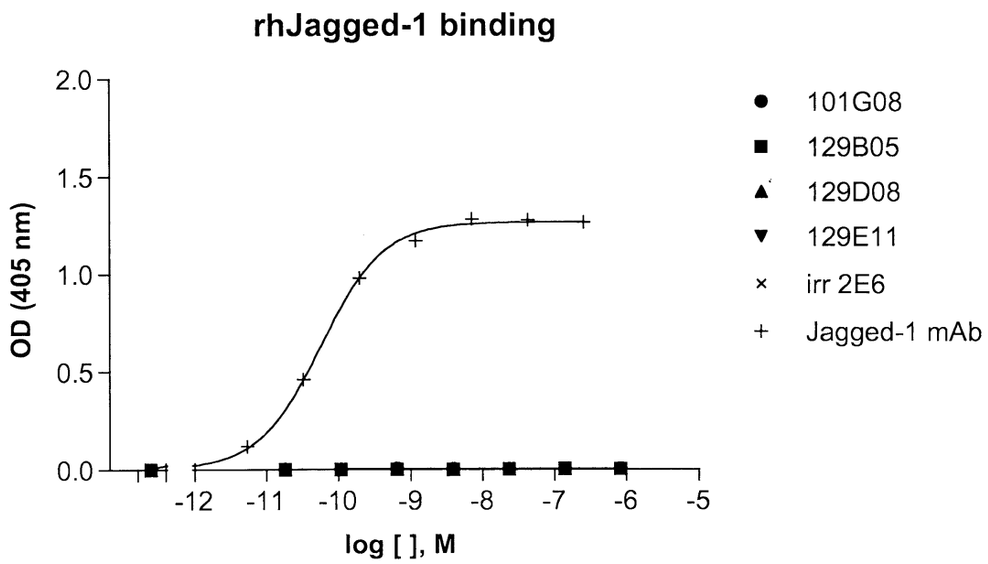

rhDLL4 binding
OD (450 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
irr 2E6
DLL4 Fab

rmDLL4 binding
OD (450 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
DLL4 Fab
irr 2E6

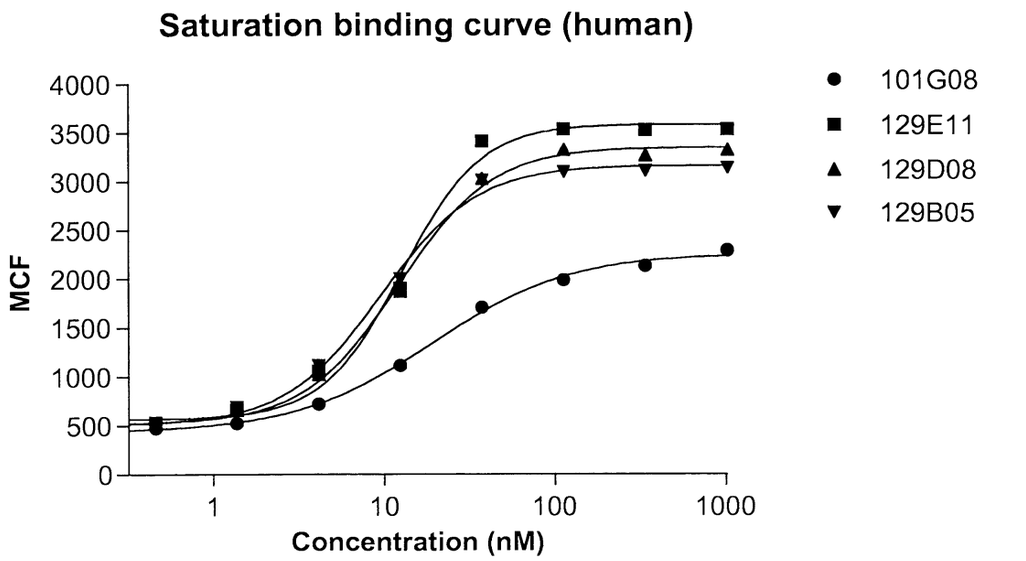

rhDLL1 binding
OD (450 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
irr 2E6
DLL1 pAb

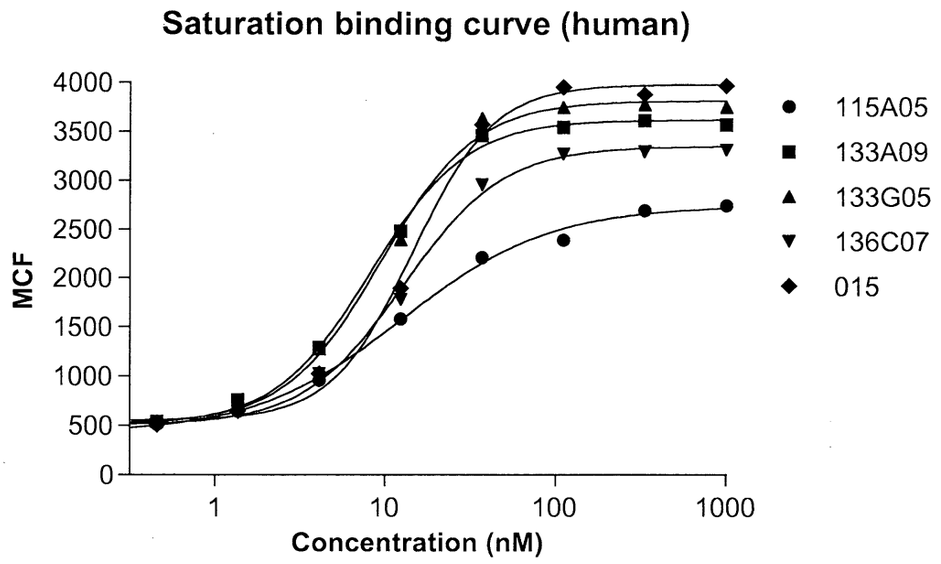

rhDLL1 binding
OD (450 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
irr 2E6
DLL1 pAb

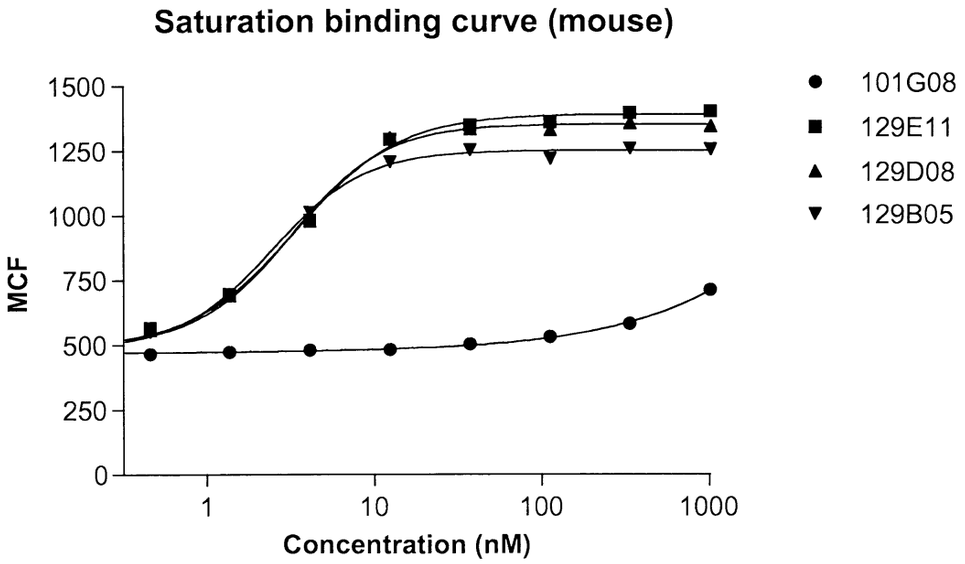
126

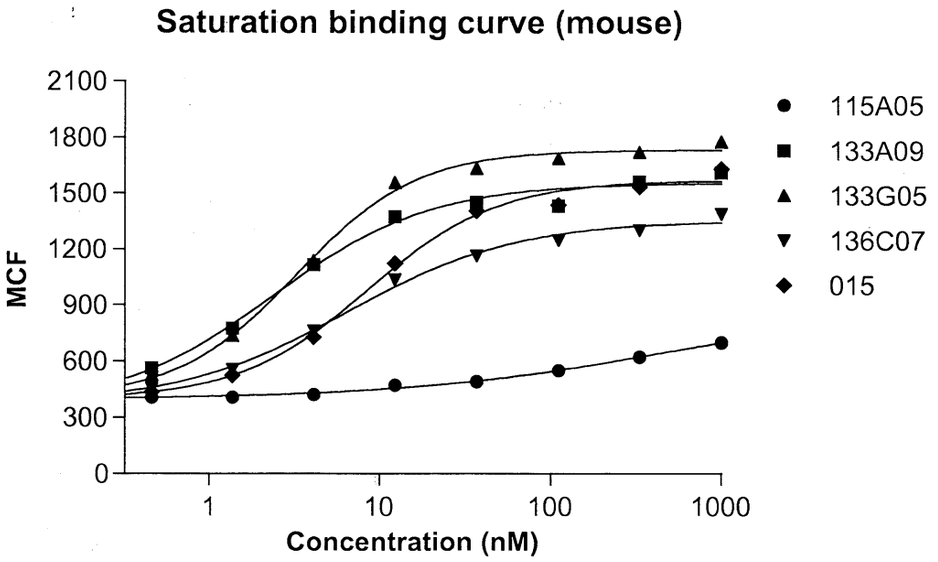

rhJagged-1 binding
OD (405 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
irr 2E6
Jagged-1 mAb

rhJagged-1 binding
OD (405 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
Jagged-1 mAb
irr 2E6

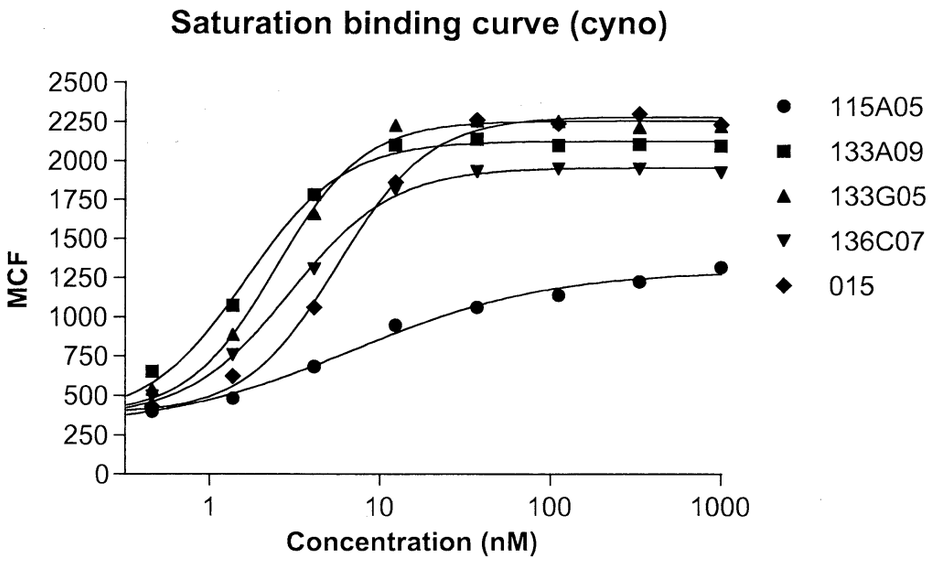

Saturation binding curve (human)
MCF
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1
10
100
1000
Concentration (nM)
101G08
129E11
129D08
129B05


Saturation binding curve (human)
MCF
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1
10
100
1000
Concentration (nM)
115A05
133A09
133G05
136C07
015


Saturation binding curve (mouse)
MCF
1500
1250
1000
750
500
250
0
1
10
100
1000
Concentration (nM)
101G08
129E11
129D08
129B05


Saturation binding curve (mouse)
MCF
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
1
10
100
1000
Concentration (nM)
115A05
133A09
133G05
136C07
015

Saturation binding curve (cyno)
MCF
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
1
10
100
1000
Concentration (nM)
101G08
129E11
129D08
129B05


Saturation binding curve (cyno)
MCF
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
1
10
100
1000
Concentration (nM)
115A05
133A09
133G05
136C07
015

130

Fig. 15

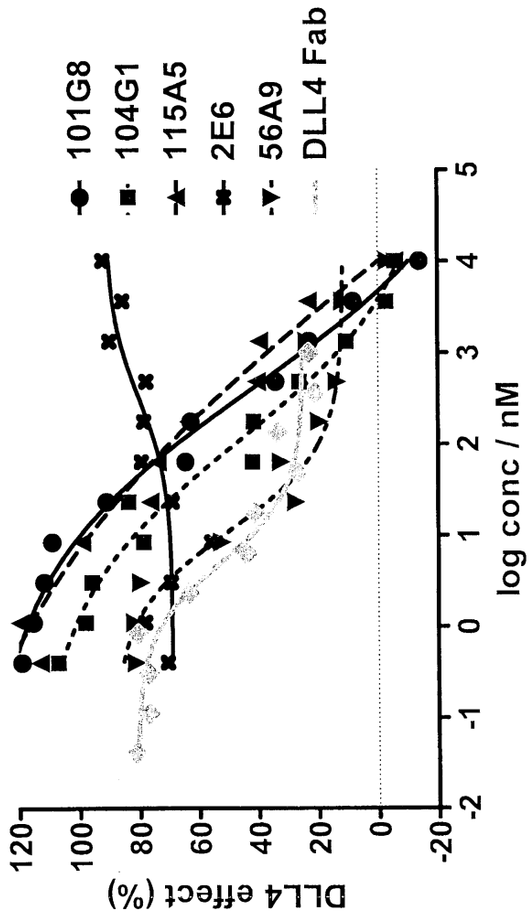
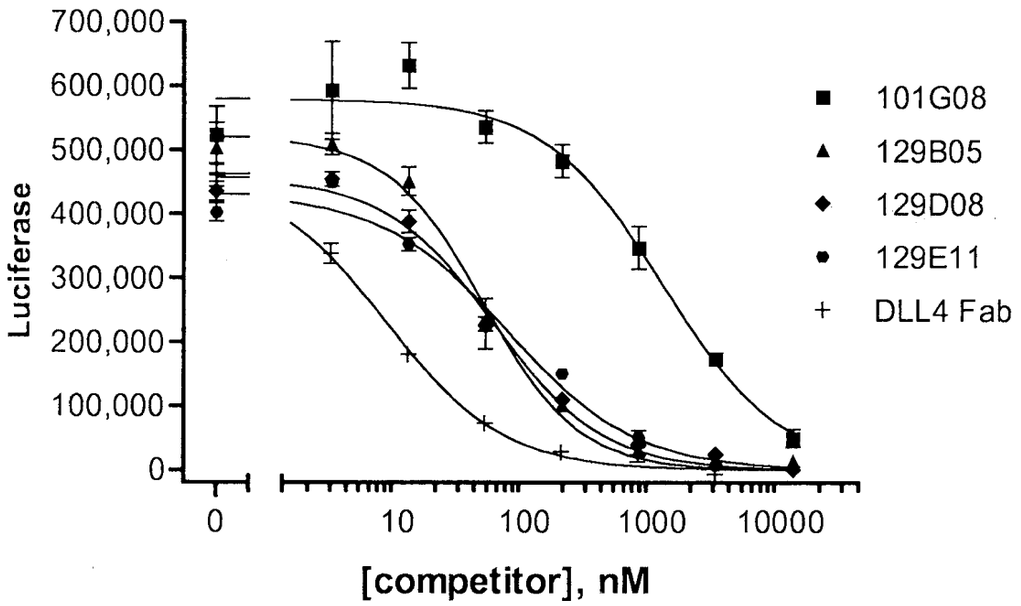

101G8
104G1
115A5
2E6
56A9
DLL4 Fab
DLL4 effect (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
4
5
log conc / nM

Fig. 16-1


700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
Luciferase
0
10
100
1000
10000
[competitor], nM
101G08
129B05
129D08
129E11
DLL4 Fab

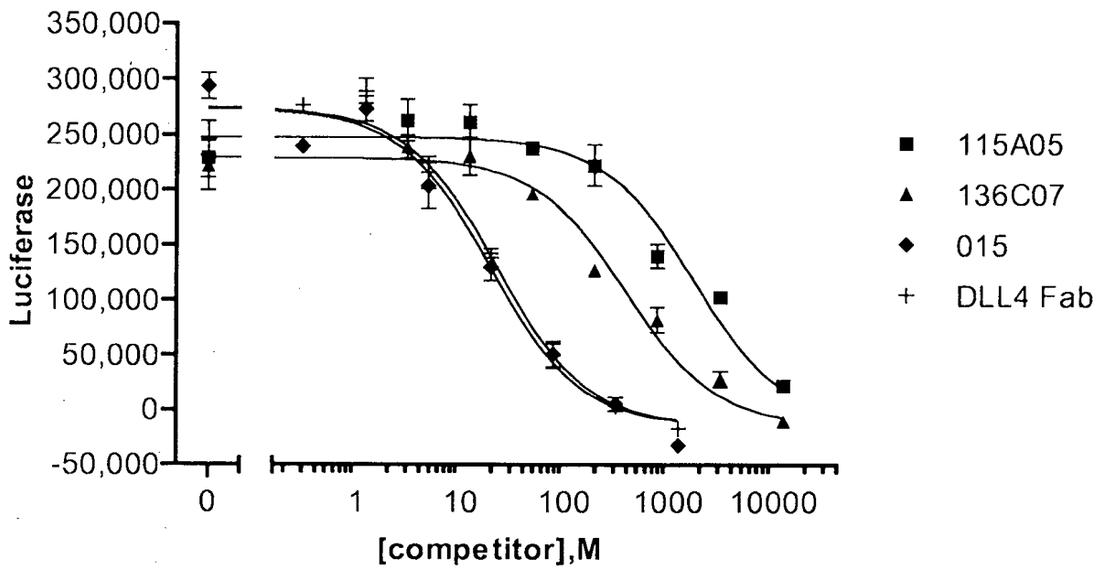
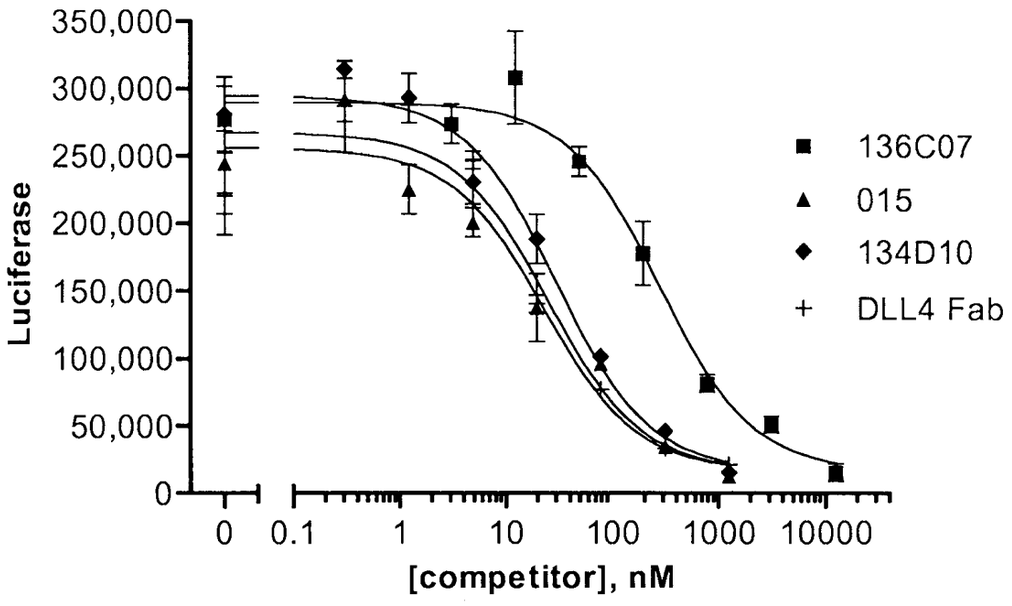

350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
-50,000
Luciferase
0
1
10
100
1000
10000
[competitor],M
115A05
136C07
015
DLL4 Fab

Fig. 16-2

A


350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
Luciferase
0
0.1
1
10
100
1000
10000
[competitor], nM
136C07
015
134D10
DLL4 Fab

B

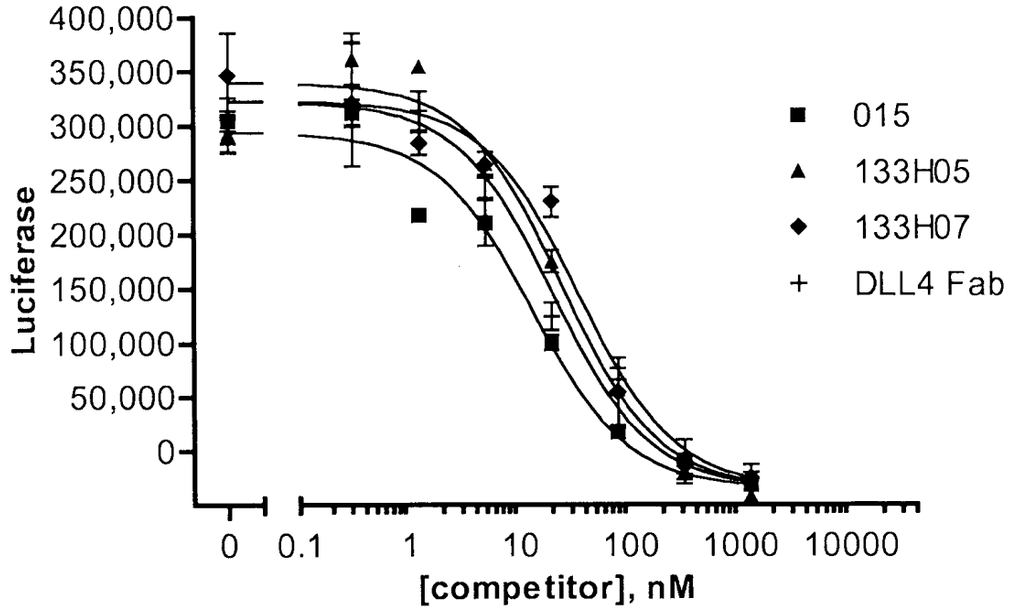

400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
Luciferase
0
0.1
1
10
100
1000
10000
[competitor], nM
015
133H05
133H07
DLL4 Fab

Figure 17

A

```
          1       10        20        30        40        50        60
          |       |         |         |         |         | a       |
Hum VH3 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISSNGGSTYYA
129B05  : ............A............R.......A.Y......ER.Y.A..RWS..TA...

                  70        80          90        100             110
                   |         | abc       |         |abcdef         |
Hum VH3 : DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-------------WGQGTLVTVSS
129B05  : ...Q.........A...V.......KP.........NRAPDTRLAPYEYDH.....Q.....
```

B

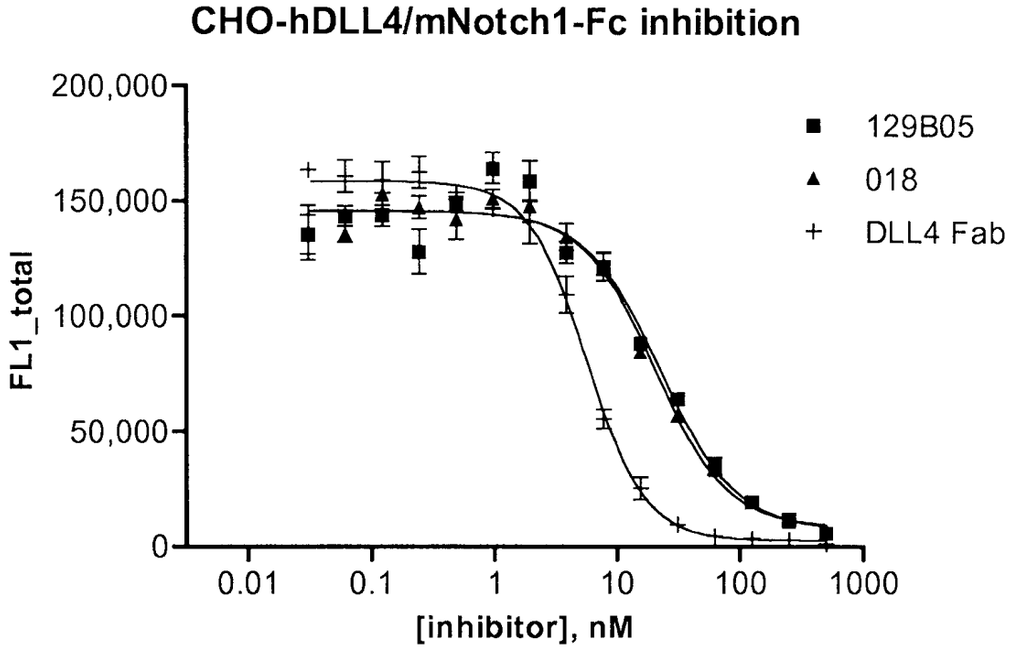
```
          1       10        20        30        40        50        60
          |       |         |         |         |         | a       |
Hum VH3 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISSNGGSTYYA
136C07  : ............................G..D.....RS....P....S.N.G.......

                  70        80          90        100                 110
                   |         | abc       |         |abcdefghijk        |
Hum VH3 : DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-------------------WGQGTLVTVSS
136C07  : .Y...........A...........KP.........ADRYIWARQGEYWGAYEYDY.....Q.....
```


18

Fig. 18-1

A


CHO-hDLL4/mNotch1-Fc inhibition
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[inhibitor], nM
129B05
018
DLL4 Fab

B-1

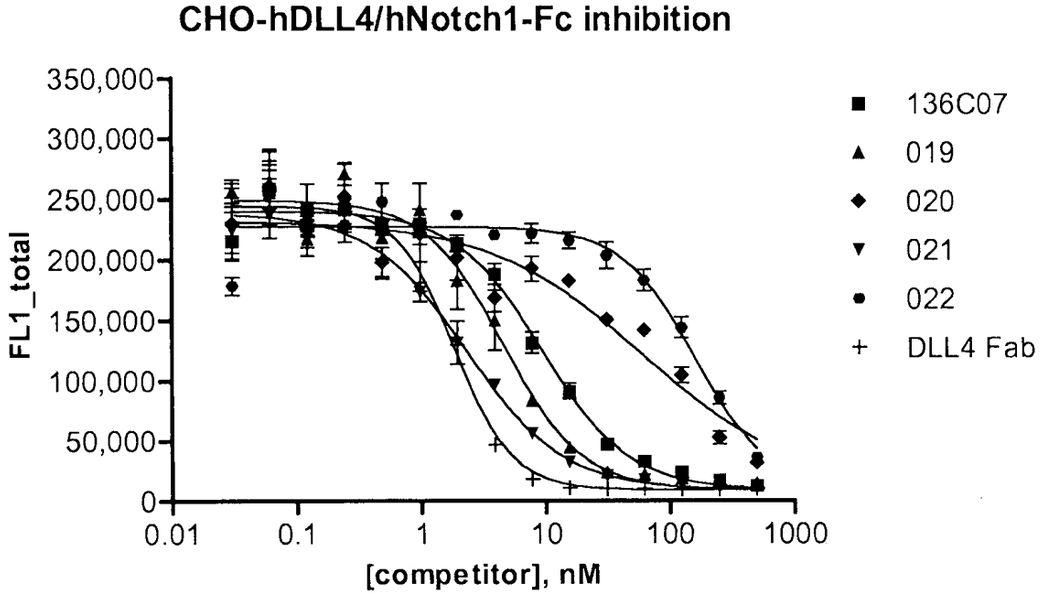
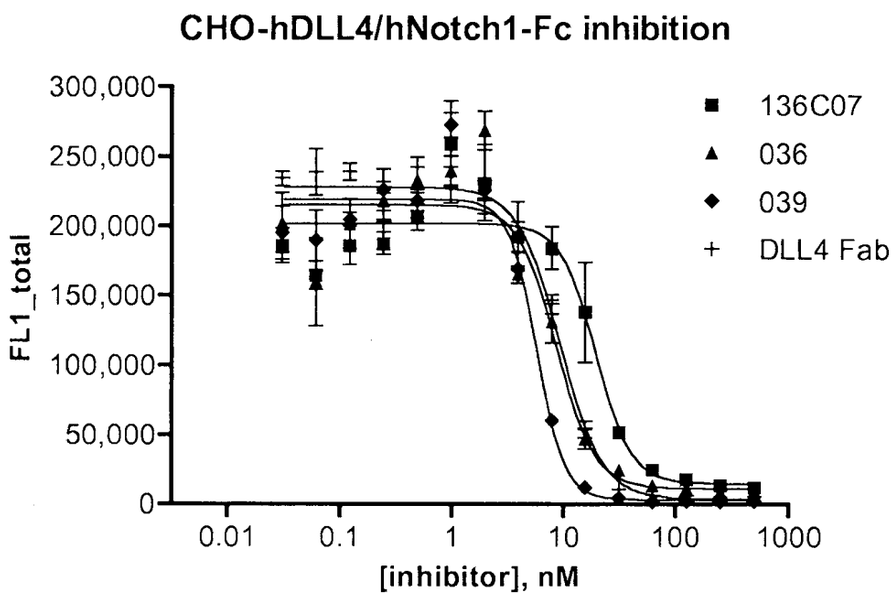

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc inhibition
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
136C07
019
020
021
022
DLL4 Fab

Fig. 18-2

B-2


CHO-hDLL4/hNotch1-Fc inhibition
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[inhibitor], nM
136C07
036
039
DLL4 Fab

B-3

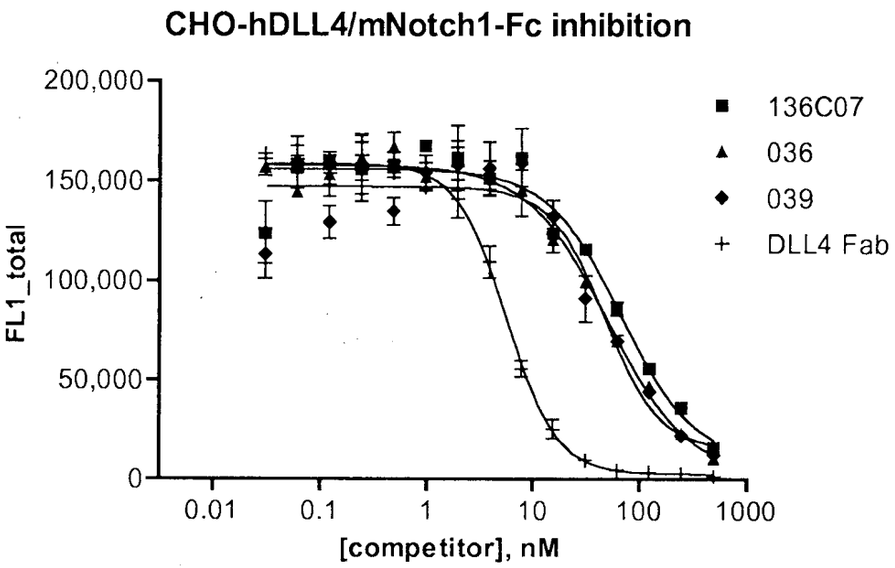
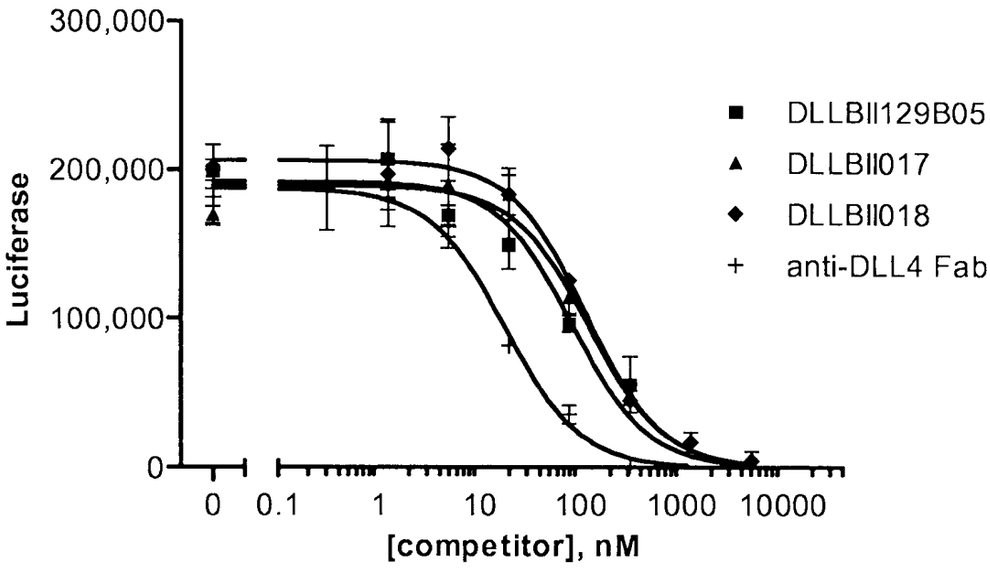

CHO-hDLL4/mNotch1-Fc inhibition
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
136C07
036
039
DLL4 Fab

Fig. 19


300,000
200,000
100,000
0
Luciferase
0 0.1 1 10 100 1000 10000
[competitor], nM
DLLBII129B05
DLLBII017
DLLBII018
anti-DLL4 Fab

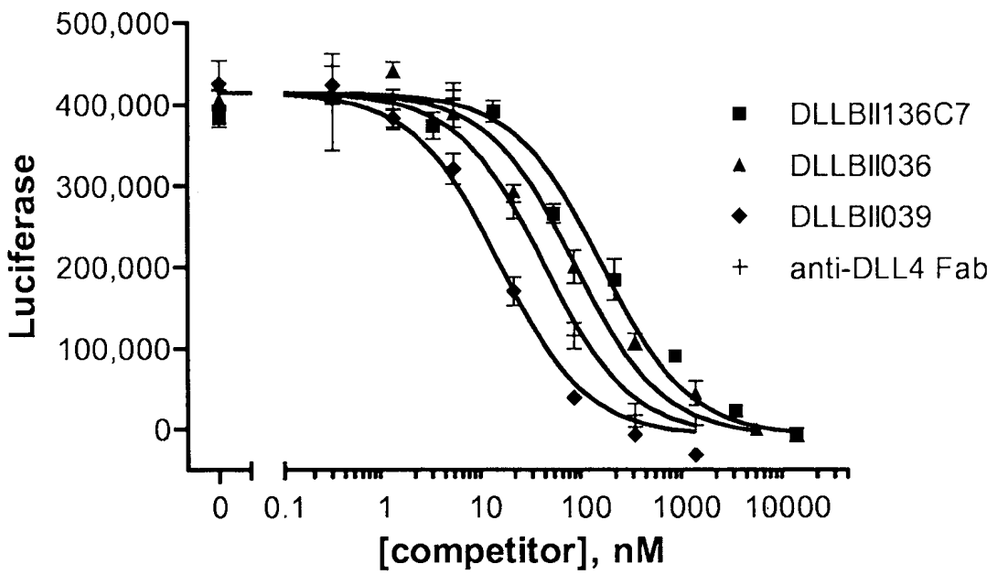

500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
Luciferase
0 0.1 1 10 100 1000 10000
[competitor], nM
DLLBII136C7
DLLBII036
DLLBII039
anti-DLL4 Fab

Fig. 20

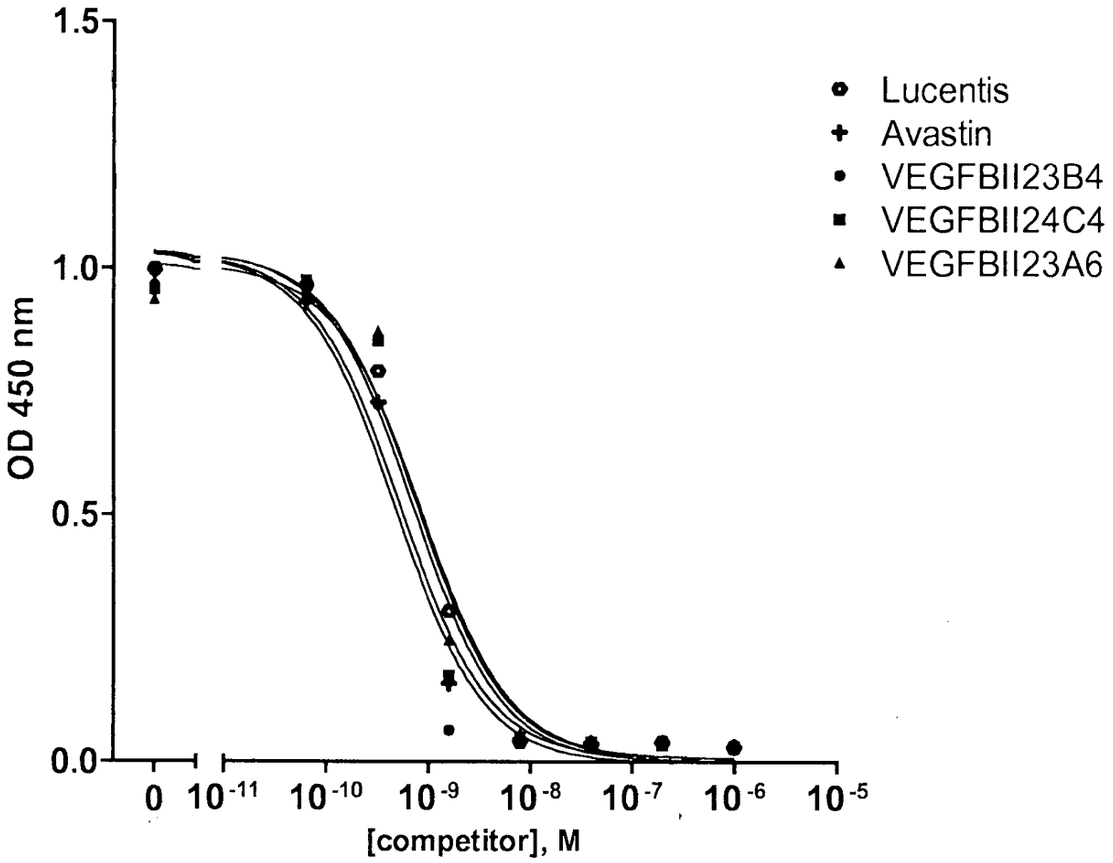

1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450 nm
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competitor], M
Lucentis
Avastin
VEGFBII23B4
VEGFBII24C4
VEGFBII23A6

Fig. 21

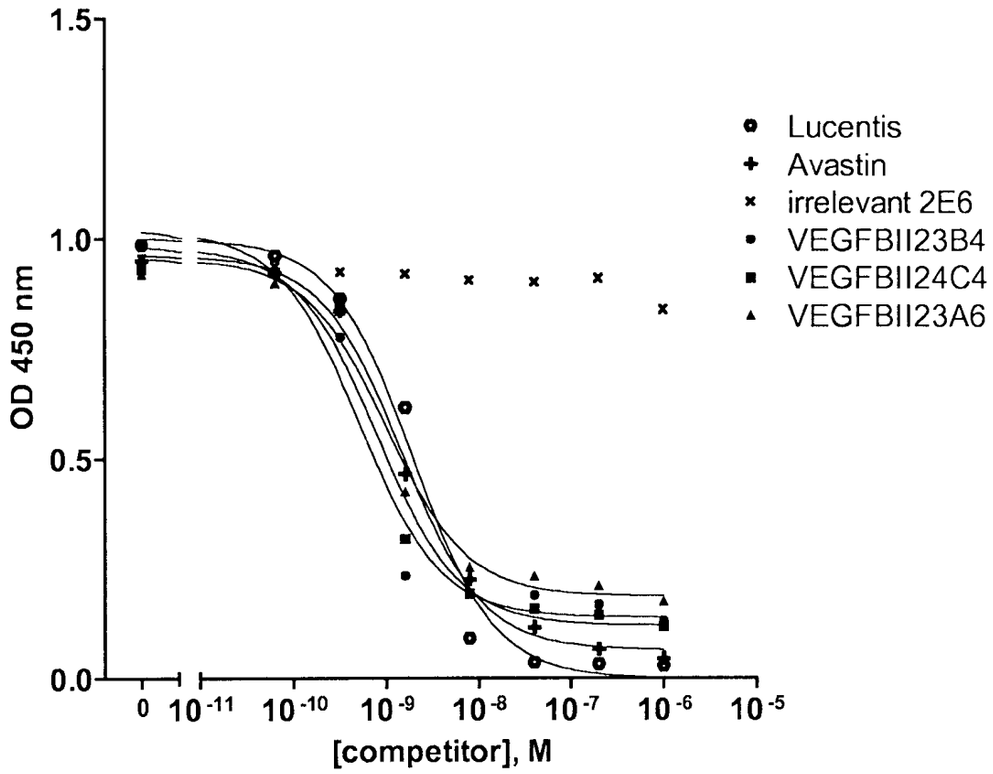

1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450 nm
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competitor], M
Lucentis
Avastin
irrelevant 2E6
VEGFBII23B4
VEGFBII24C4
VEGFBII23A6

Fig. 22

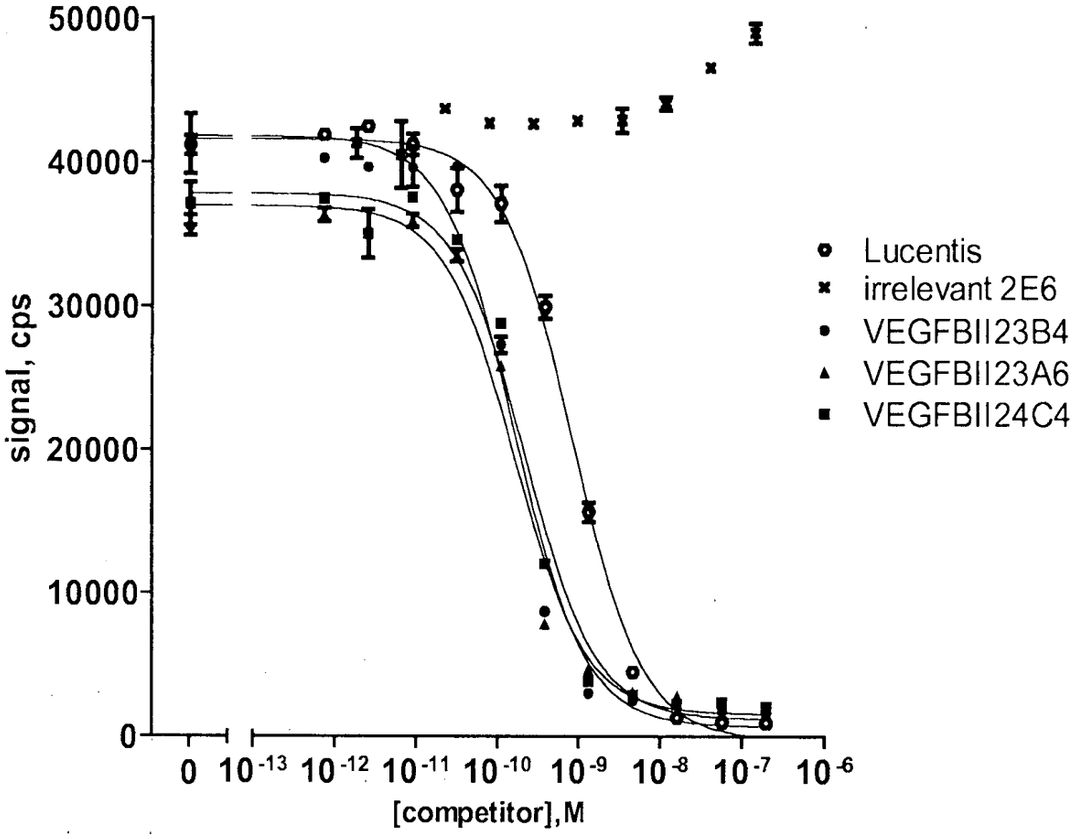

50000
40000
30000
20000
10000
0
signal, cps
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competitor],M
Lucentis
irrelevant 2E6
VEGFBII23B4
VEGFBII23A6
VEGFBII24C4

Fig. 23

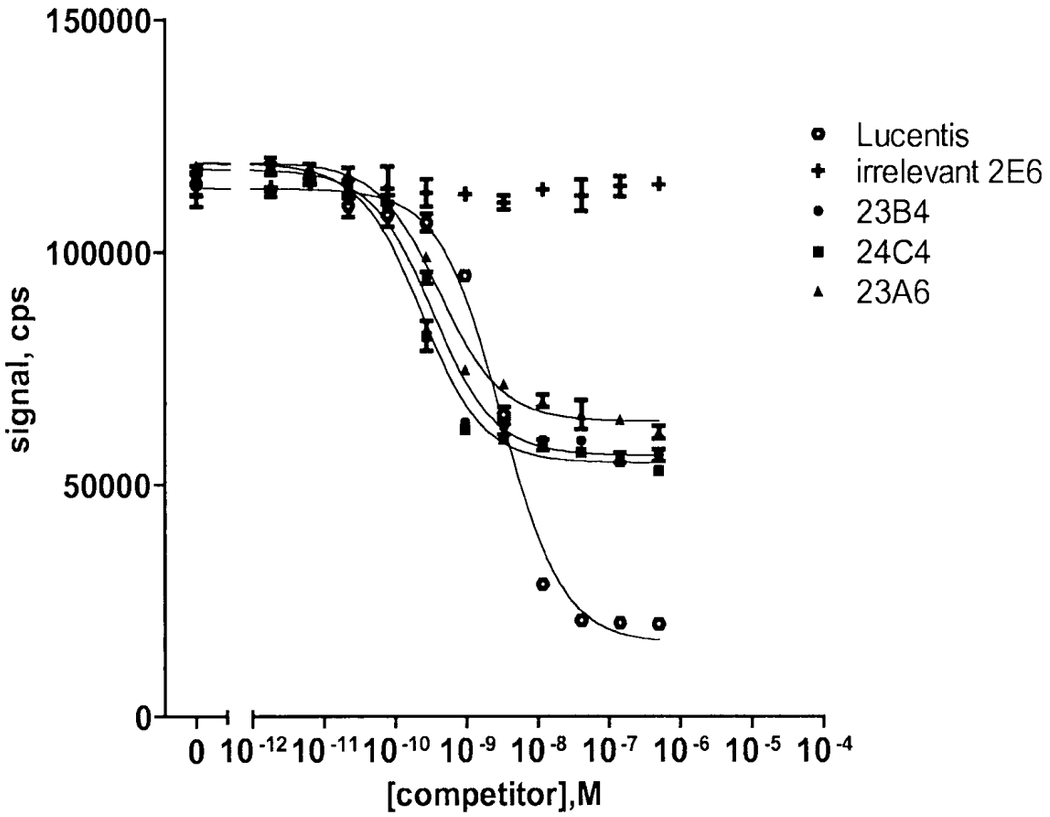
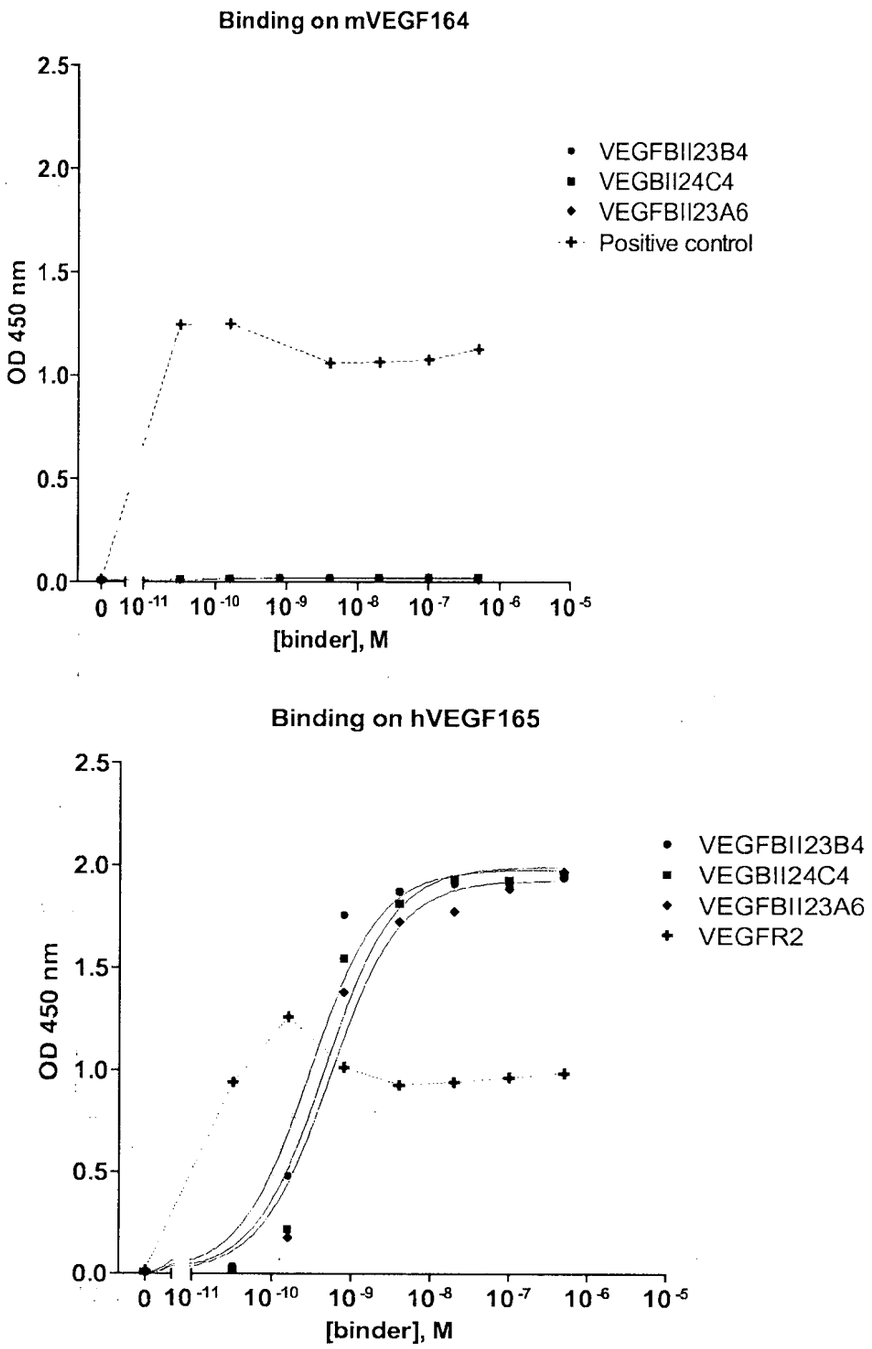

150000
100000
50000
0
signal, cps
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5 10-4
[competitor],M
Lucentis
irrelevant 2E6
23B4
24C4
23A6

Fig. 24


Binding on mVEGF164
OD 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[binder], M
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
Positive control
Binding on hVEGF165
OD 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[binder], M
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGFR2

136

Fig. 25

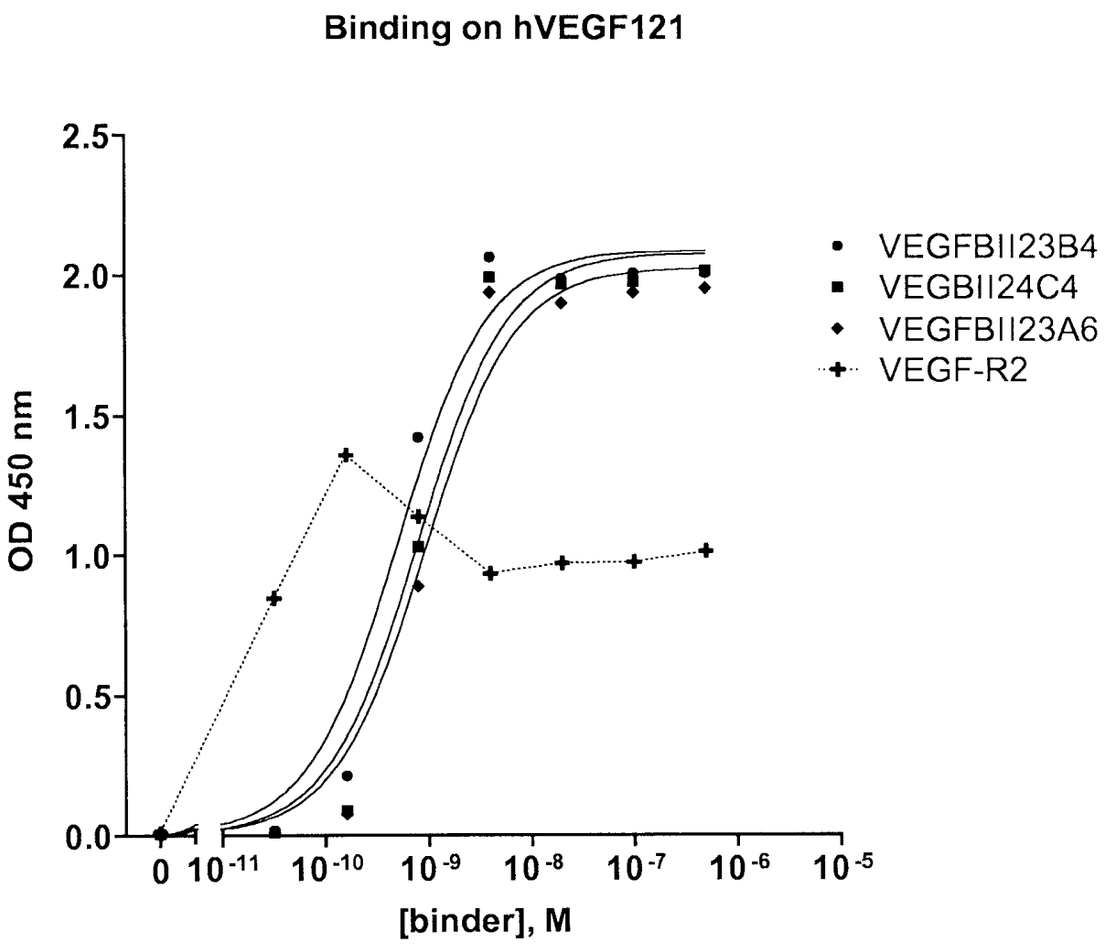
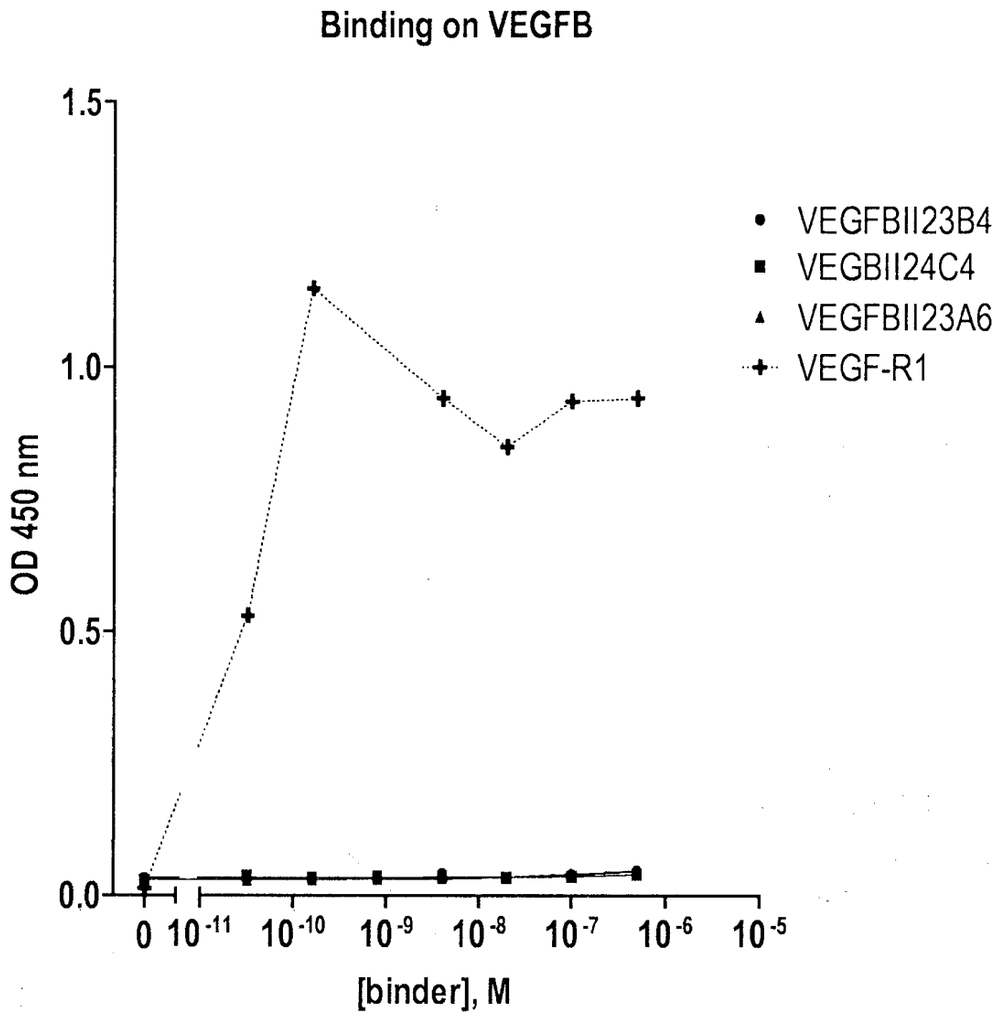

Binding on hVEGF121
OD 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[binder], M
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGF-R2

Fig. 26-1



137
136

Fig. 26-2

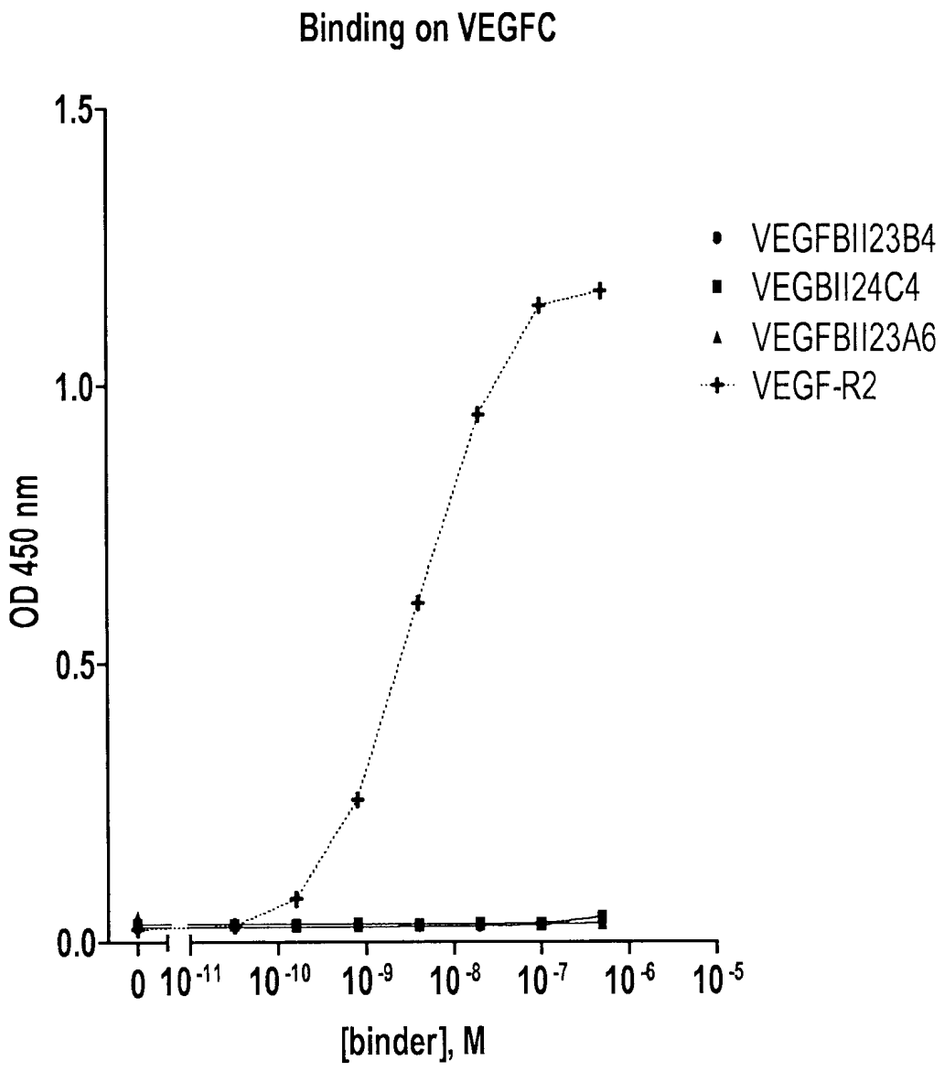

Binding on VEGFC
1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450 nm
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[binder], M
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGF-R2

Fig. 26-3

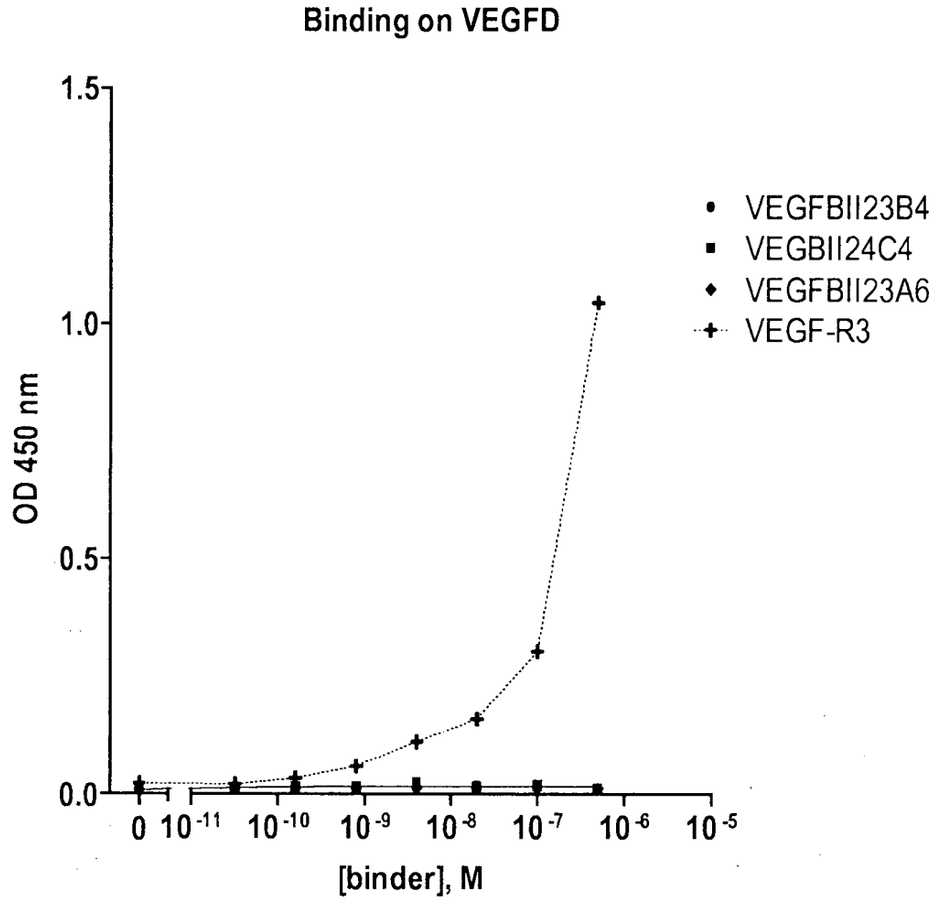

Binding on VEGFD
OD 450 nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[binder], M
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGF-R3

Fig. 26-4

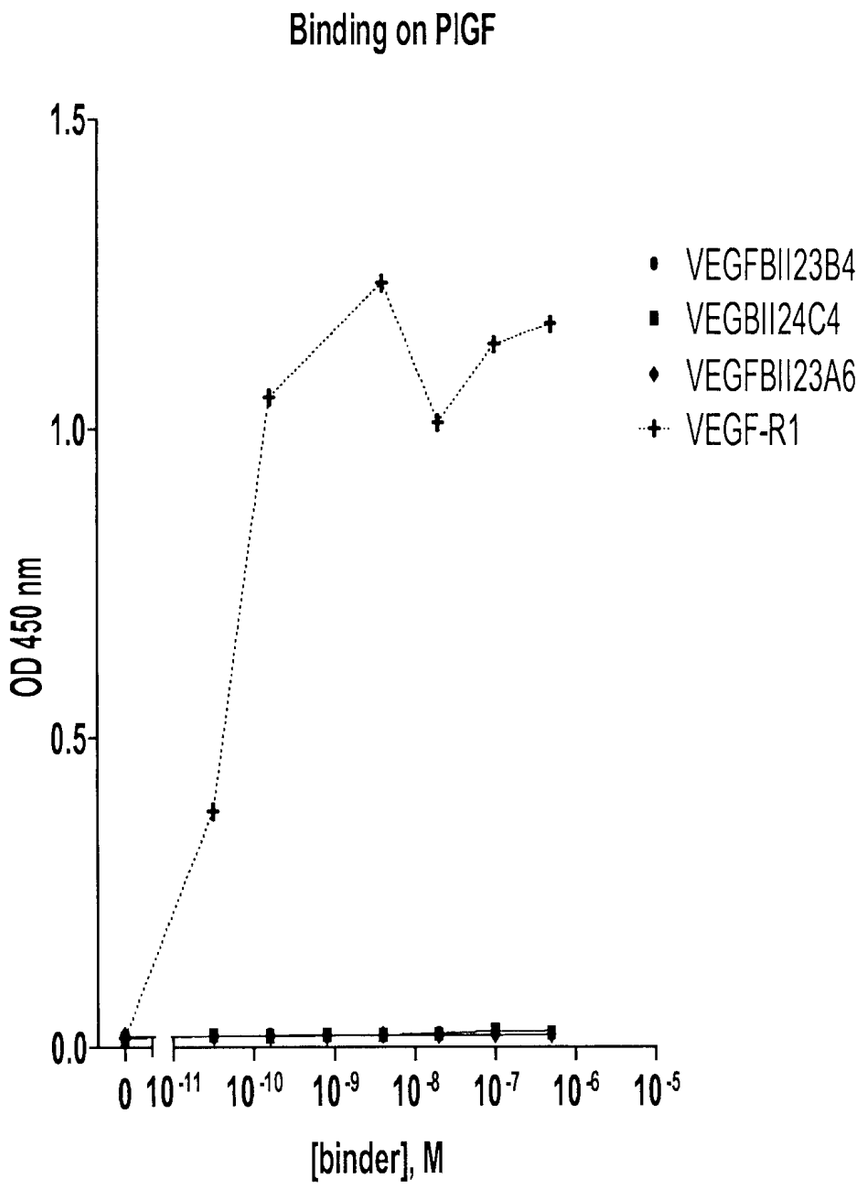
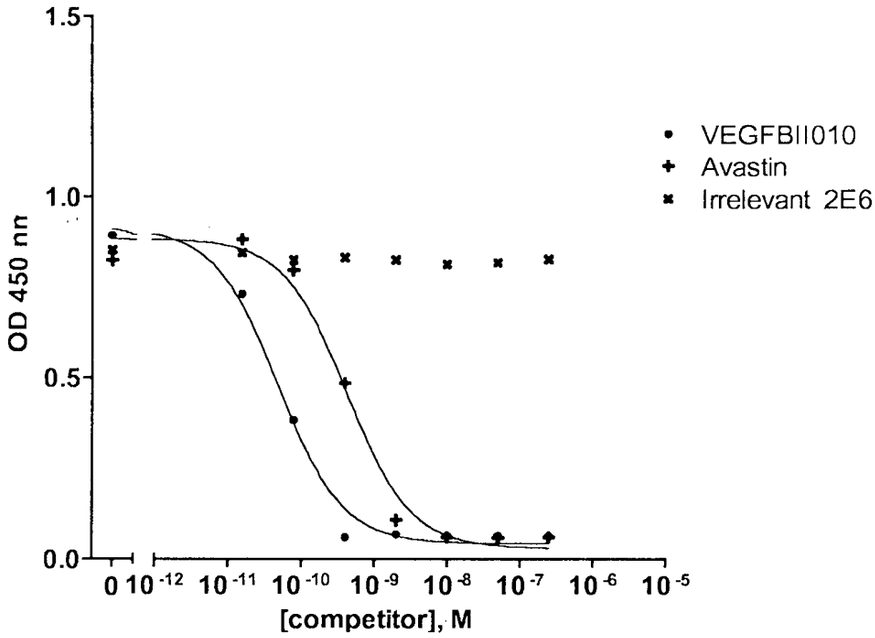
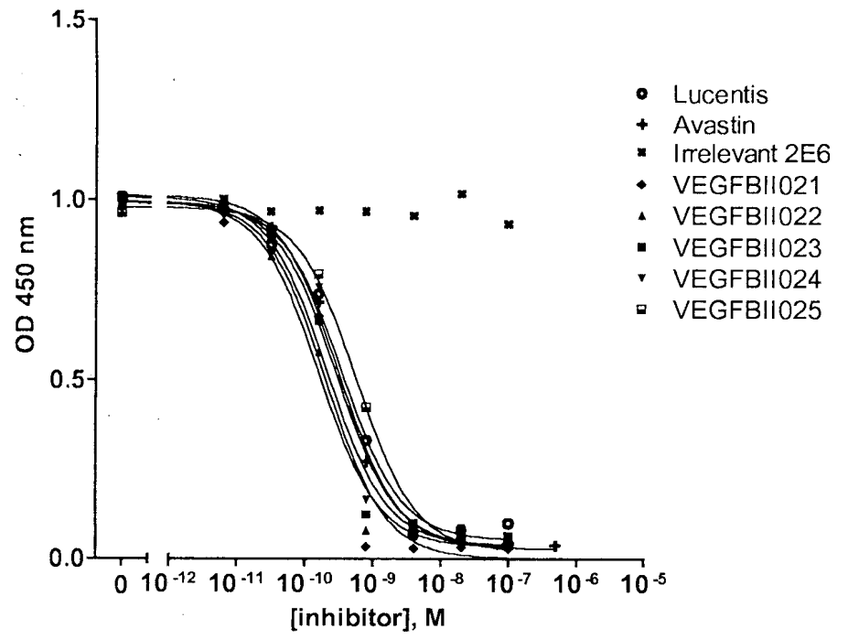

Binding on PlGF
1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450 nm
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGF-R1
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[binder], M

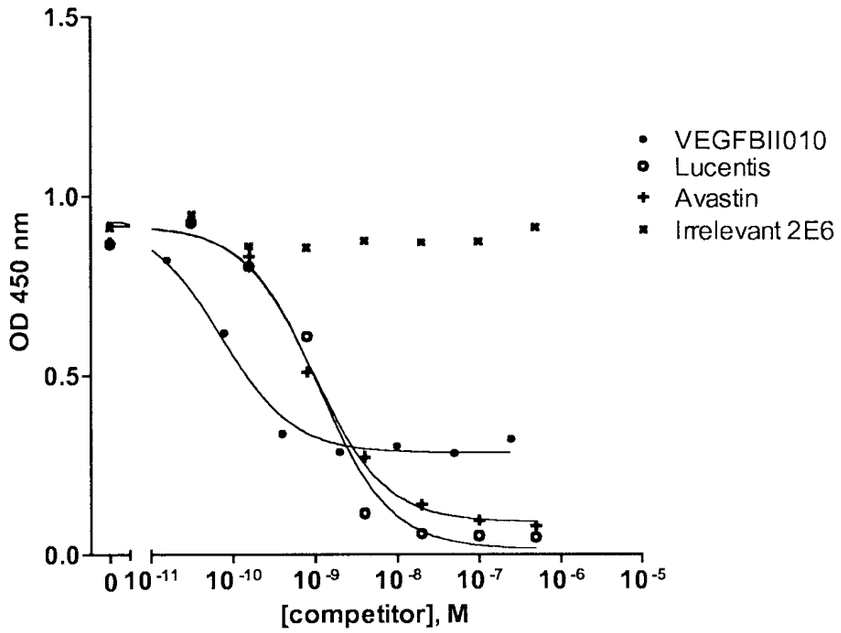
Fig. 27





139
~~139~~

Fig. 28


1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450 nm
0 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[competitor], M
VEGFBII010
Lucentis
Avastin
Irrelevant 2E6

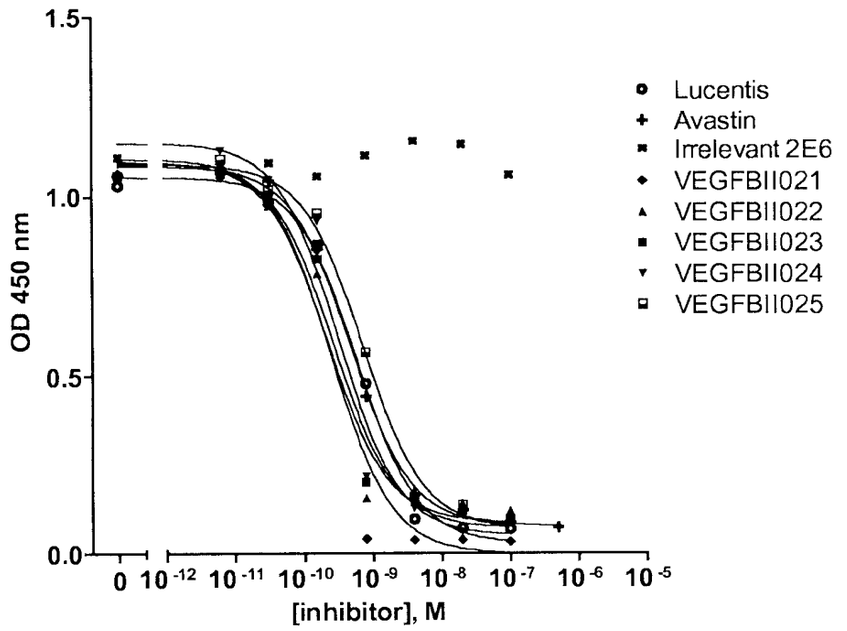

1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450 nm
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[inhibitor], M
Lucentis
Avastin
Irrelevant 2E6
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

Fig. 29

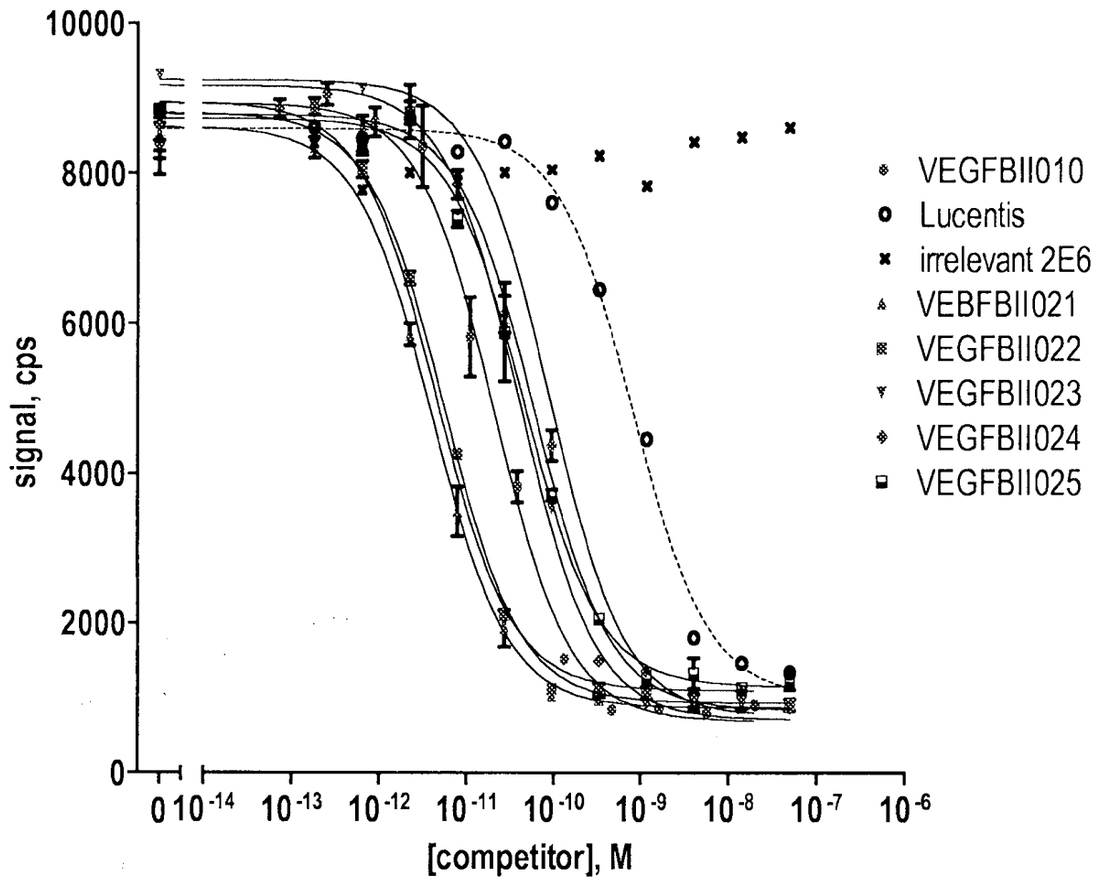
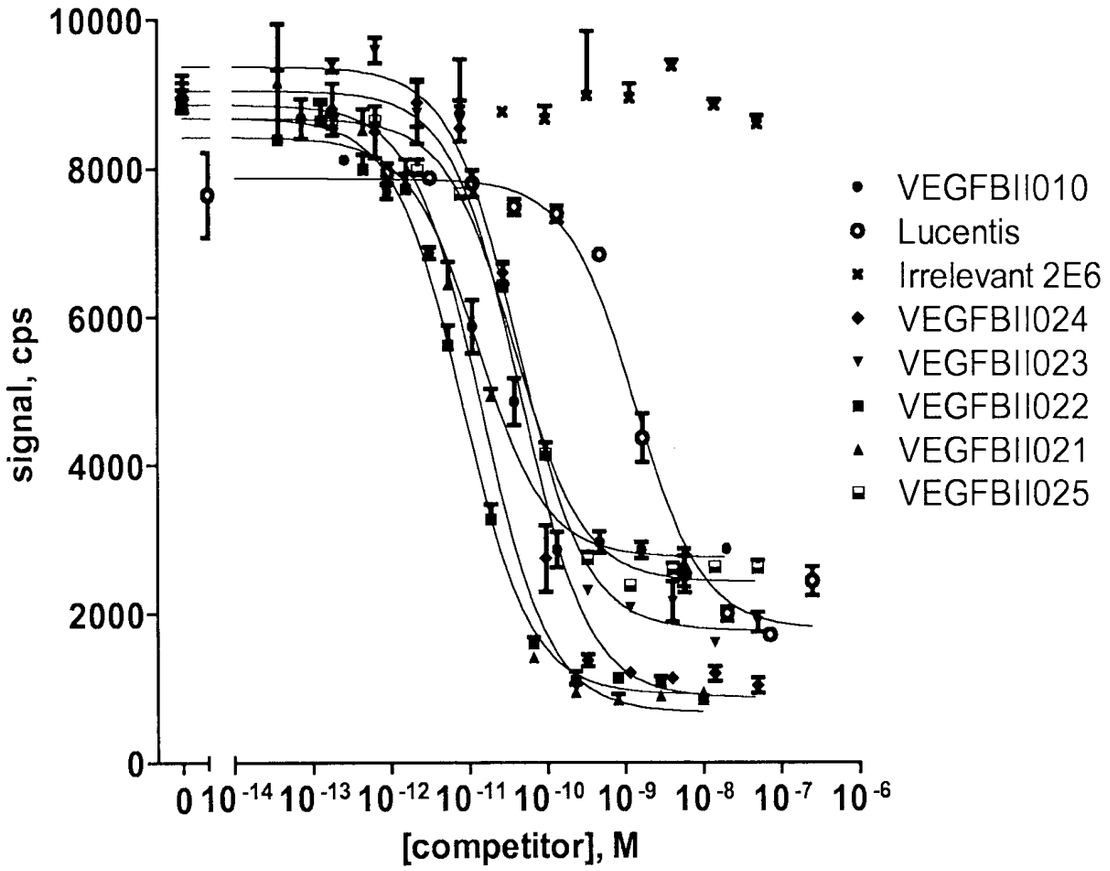
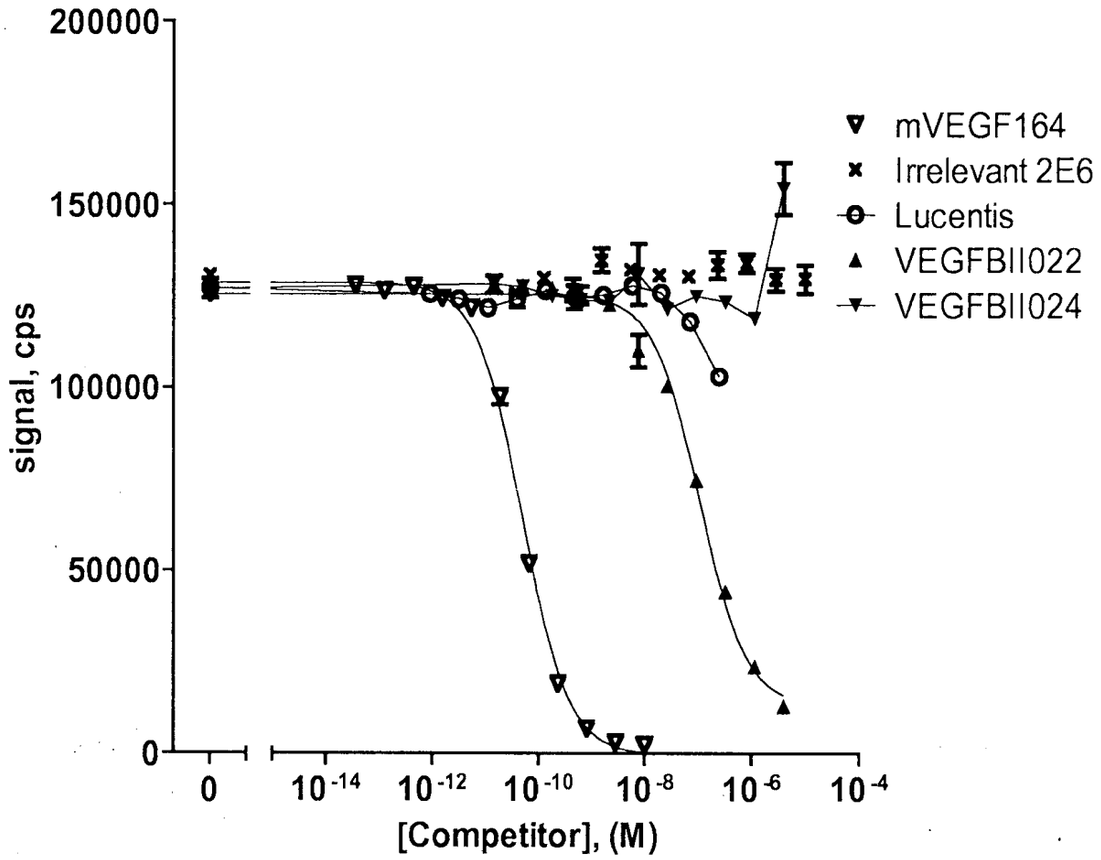

10000
8000
6000
4000
2000
0
signal, cps
0 10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competitor], M
VEGFBII010
Lucentis
irrelevant 2E6
VEBFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

Fig. 30


10000
8000
6000
4000
2000
0
signal, cps
0 10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competitor], M
VEGFBII010
Lucentis
Irrelevant 2E6
VEGFBII024
VEGFBII023
VEGFBII022
VEGFBII021
VEGFBII025

77 / 129
Fig. 31



141

78 / 129
Fig. 32

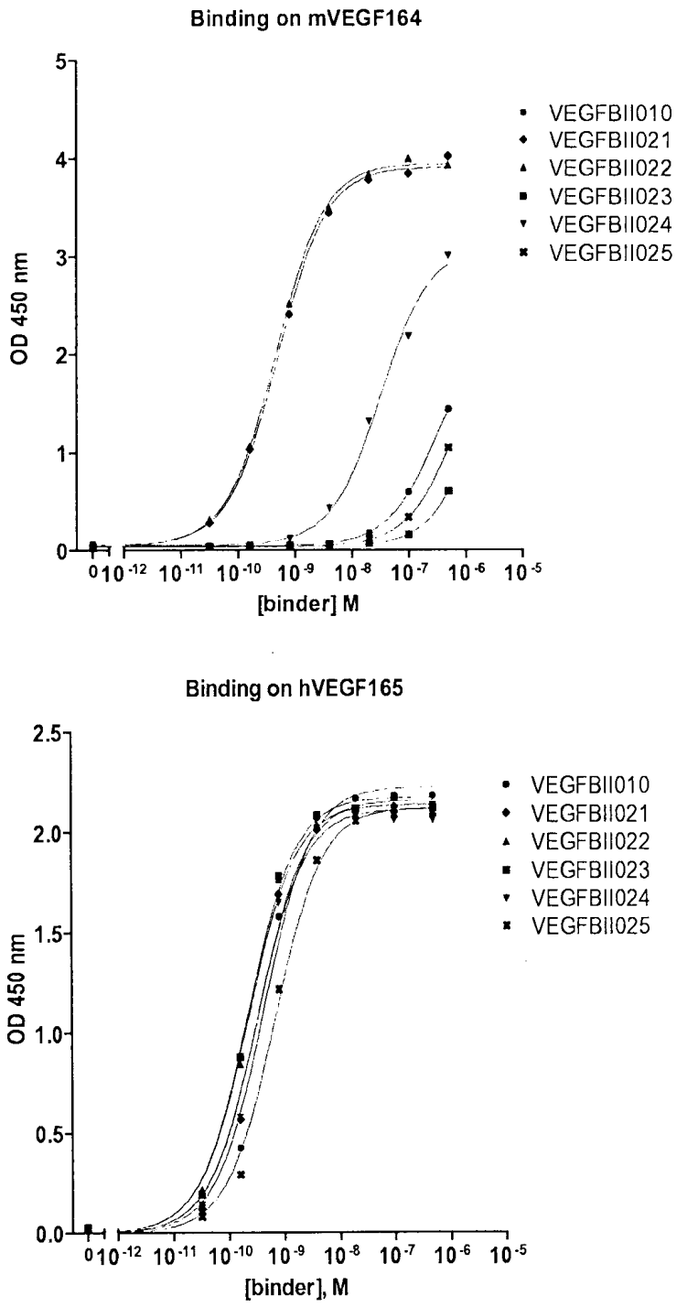
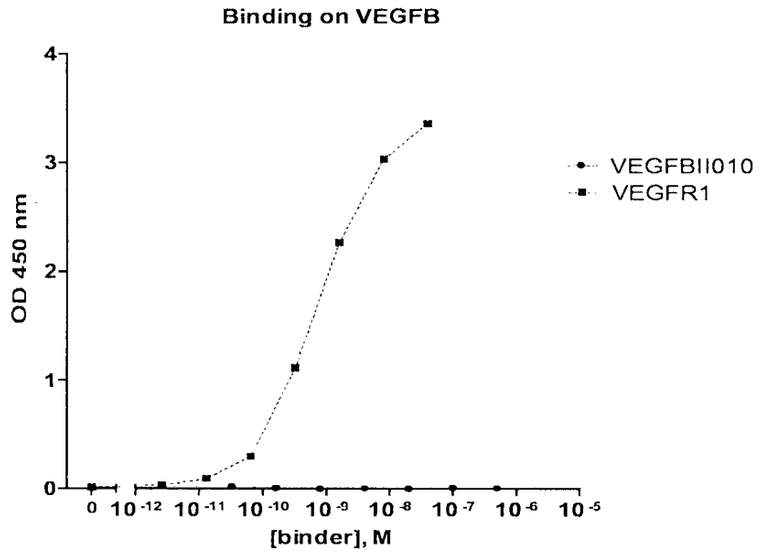

Binding on mVEGF164
OD 450 nm
[binder] M
VEGFBII010
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
Binding on hVEGF165
OD 450 nm
[binder], M
VEGFBII010
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

Fig. 33-1


Binding on VEGFB
OD 450 nm
[binder], M
VEGFBII010
VEGFR1

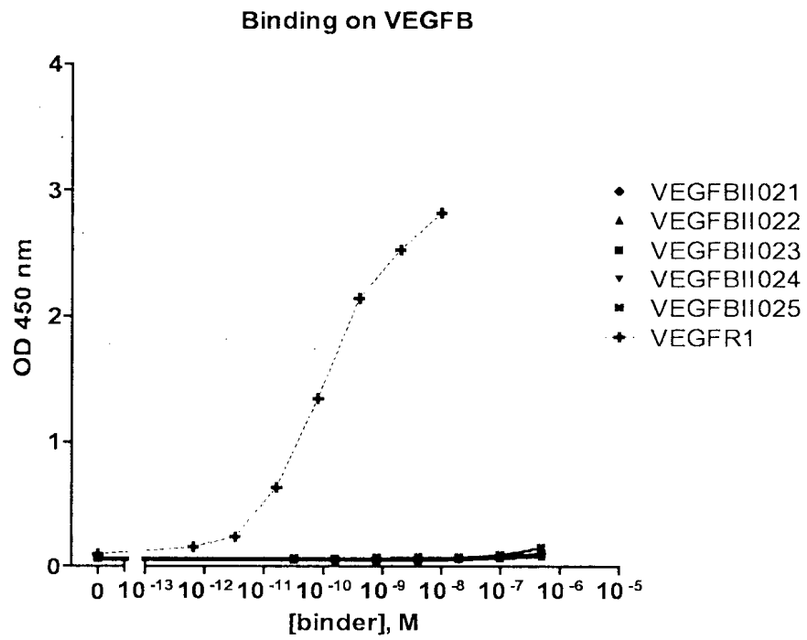
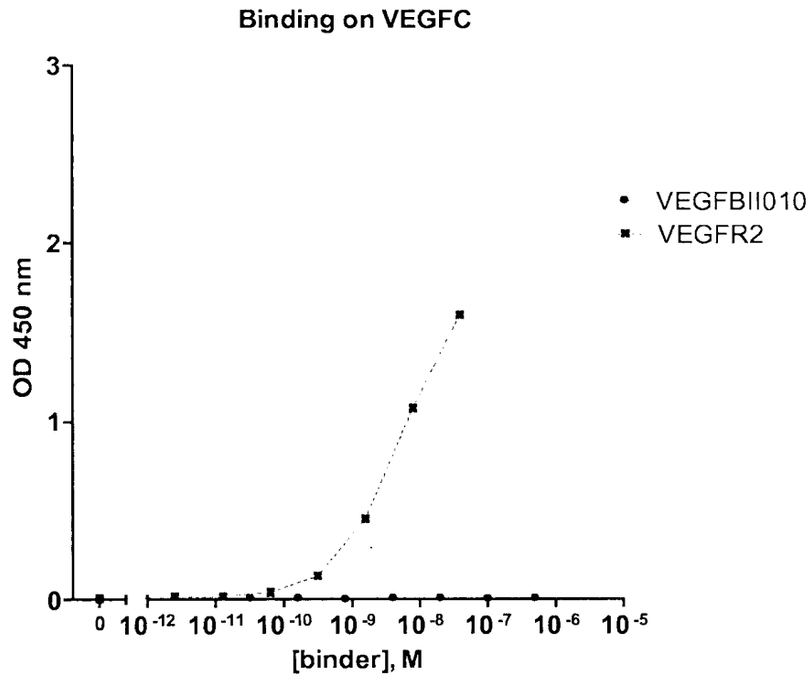

Binding on VEGFB
OD 450 nm
[binder], M
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
VEGFR1

Fig. 33-2


Binding on VEGFC
OD 450 nm
3
2
1
0
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[binder], M
VEGFBII010
VEGFR2

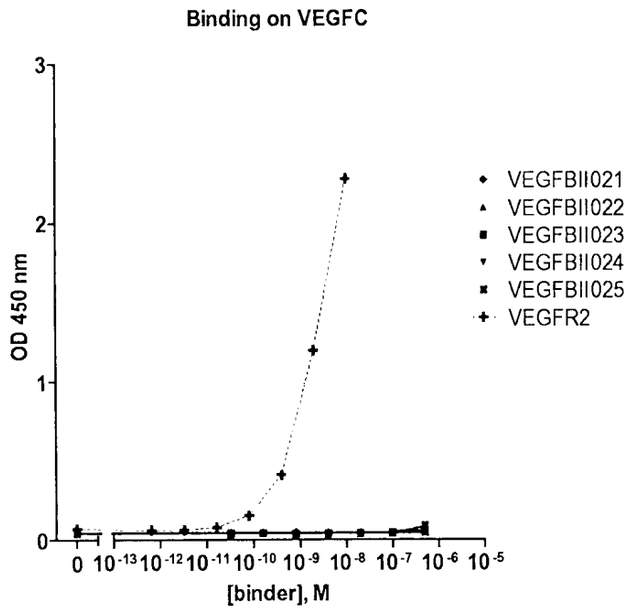
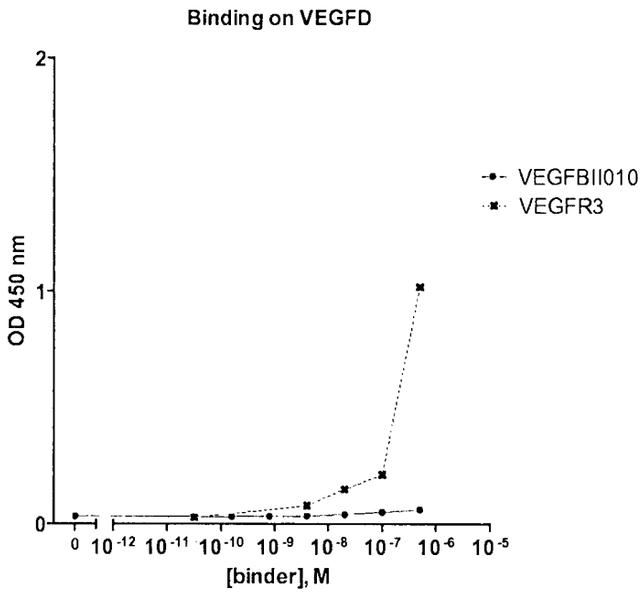
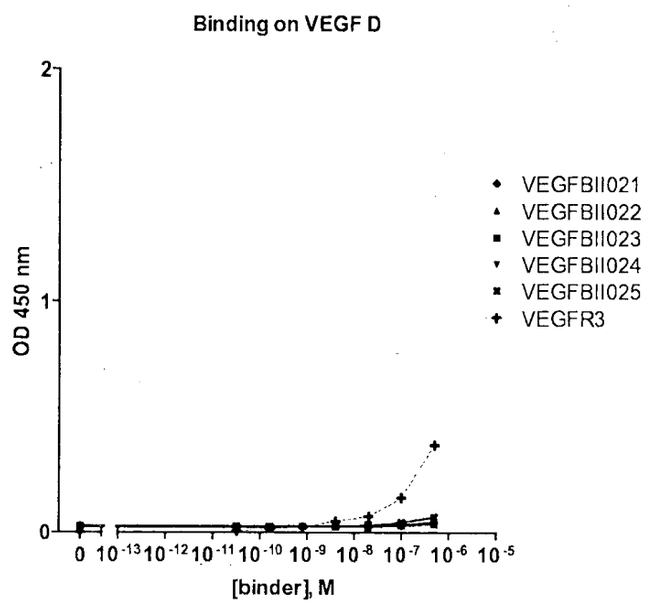

Binding on VEGFC
OD 450 nm
3
2
1
0
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[binder], M
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
VEGFR2

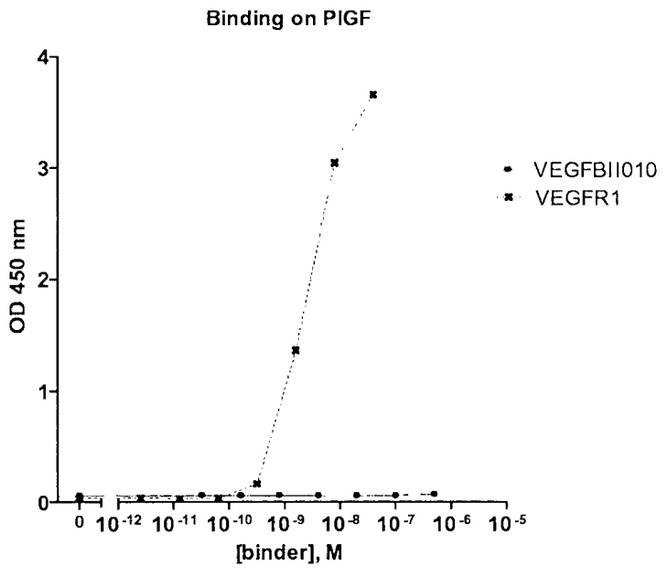
Fig. 33-3





145
A48

Fig. 33-4


Binding on PlGF
OD 450 nm
0
1
2
3
4
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[binder], M
VEGFBII010
VEGFR1

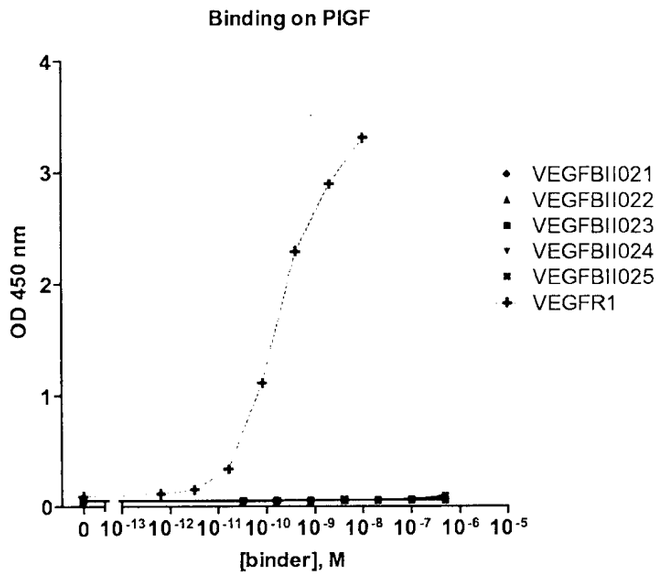

Binding on PlGF
OD 450 nm
0
1
2
3
4
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[binder], M
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
VEGFR1

Fig. 34

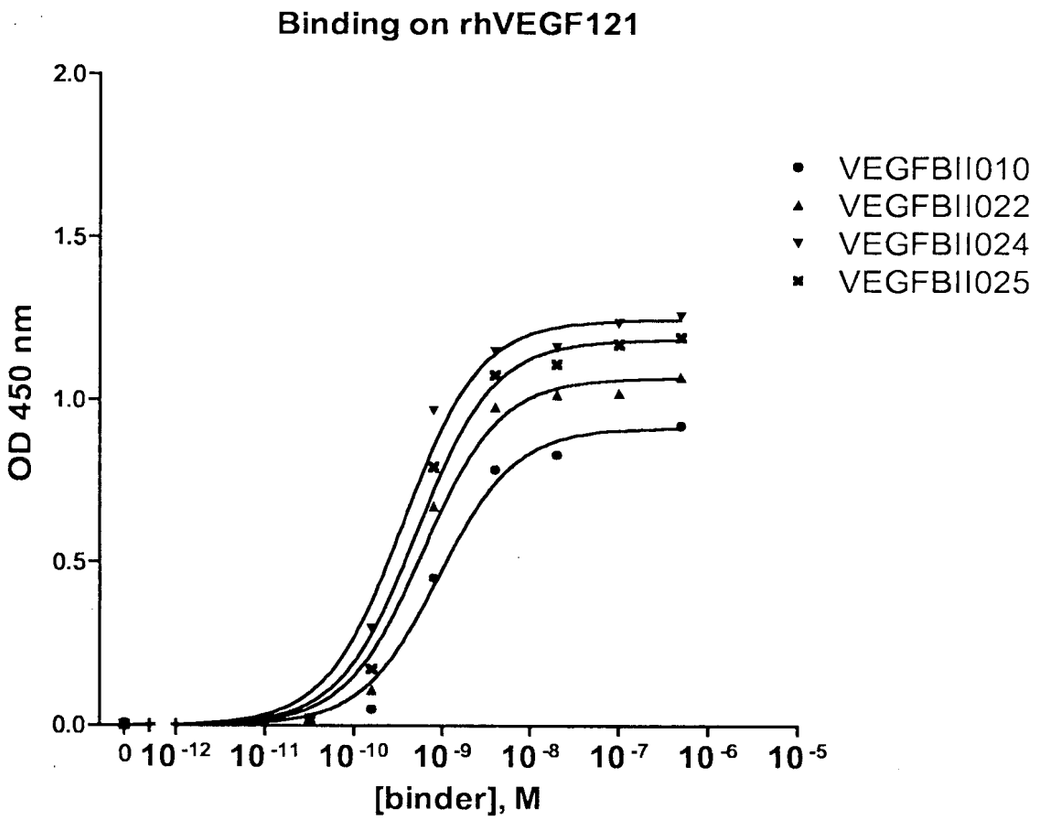
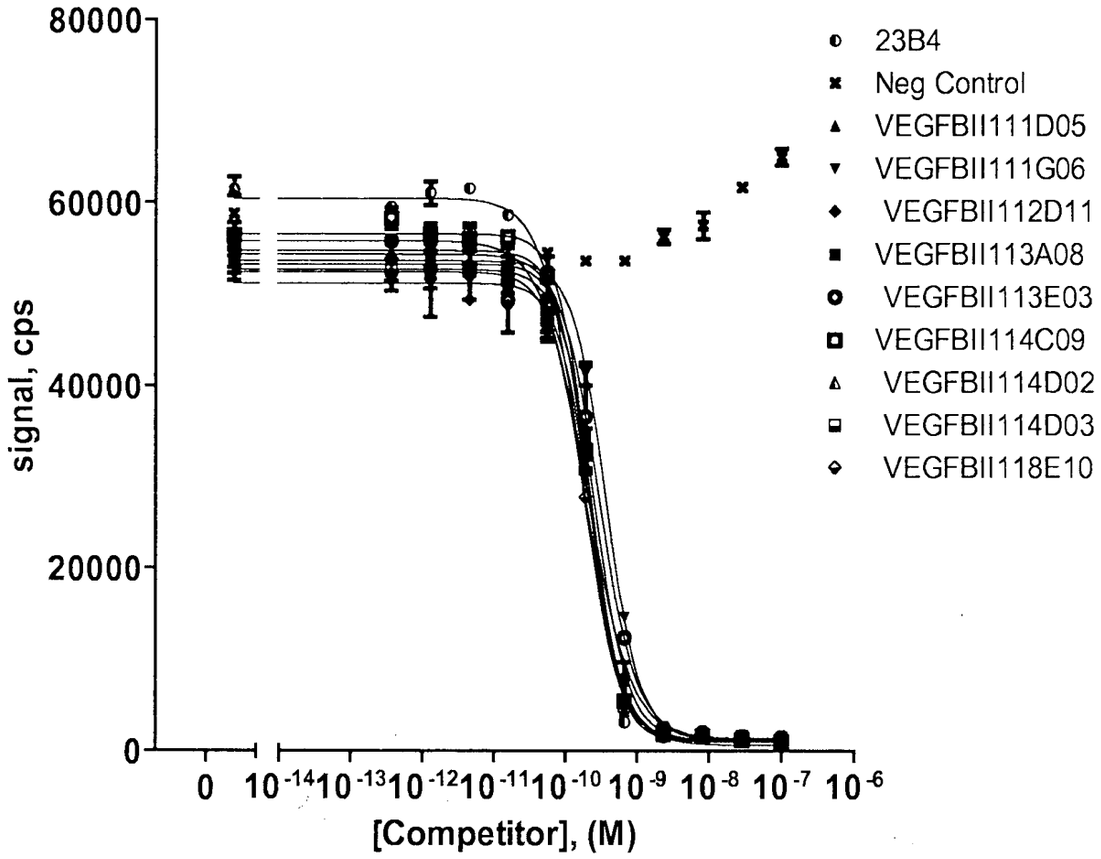

Binding on rhVEGF121
OD 450 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[binder], M
VEGFBII010
VEGFBII022
VEGFBII024
VEGFBII025

Figure 35

```
                10        20        30        40        50        60
                |.........|.........|.........|.........|.........|
Kabat#      :   .....................|.....................|..a.....|
VH3-23/JH5  :   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
VEGFBII23B04:   .....T.D.....EV..R.....S.G.F...Q..ER.F.V...-K..YK.DS

                70        80        90        100       110
                |.........|.........|.........|.........|.....|
Kabat#      :   .....|.....|..abc....|.....|.....|abcdefghi.....|....
VH3-23/JH5  :   DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------WGQGTLVTVSS
VEGFBII23B04:   V.LE.....K..A...V...I...KP.........SSRAYGSSRLRLADTYEY.....Q.....
```

Fig. 36



145
149

Fig. 37

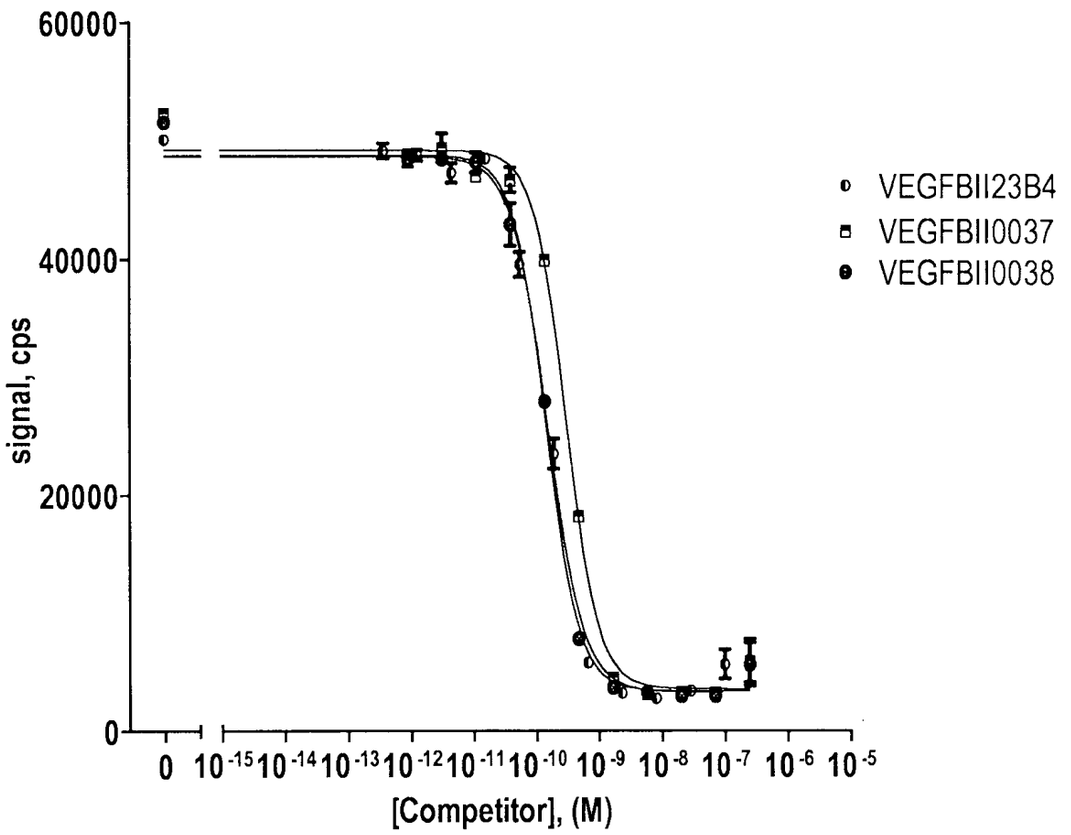

60000
40000
20000
0
signal, cps
0 10-15 10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[Competitor], (M)
VEGFBII23B4
VEGFBII0037
VEGFBII0038

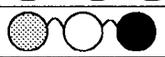
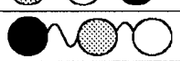
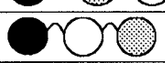
Figure 38

```
                          10        20        30        40        50        60
Kabat#              : .........|.........|.........|.........|.........|..a.....|
VH3-23/JH5          : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
PVEGFBIIPMP5B5      : ......................V...IR.MSM.--.Y......HR.L.AR..-...T.A.V

                          70        80            90        101       110
Kabat#              : .........|.........|..abc.....|.........|.........|...
VH3-23/JH5          : DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-------WGQGTLVTVSS
PVEGFBIIPMP5B5      : ................V.......KA.........NTFSSRPNP..A..Q.....
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

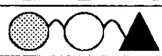
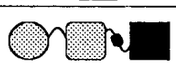
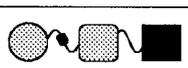
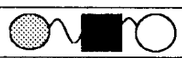
88 / 129
Fig. 39

VHH ID	format	description
VEGFDLLBII001		DLLBII101G08-*35gs,cys15*-VEGFBII23B04
VEGFDLLBII002		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-DLLBII101G08
VEGFDLLBII003		VEGFBII23B04-*35gs*-DLLBII101G08-*9gs*-ALB8
VEGFDLLBII004		VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8-*9gs*-DLLBII101G08
VEGFDLLBII005		DLLBII101G08-*35gs*-VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8
VEGFDLLBII006		DLLBII101G08-*9gs*-ALB8-*9gs*-VEGFBII23B04

Legend:

Nanobody or linker	description
	DLLBII101G08
	VEGFBII23B04
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

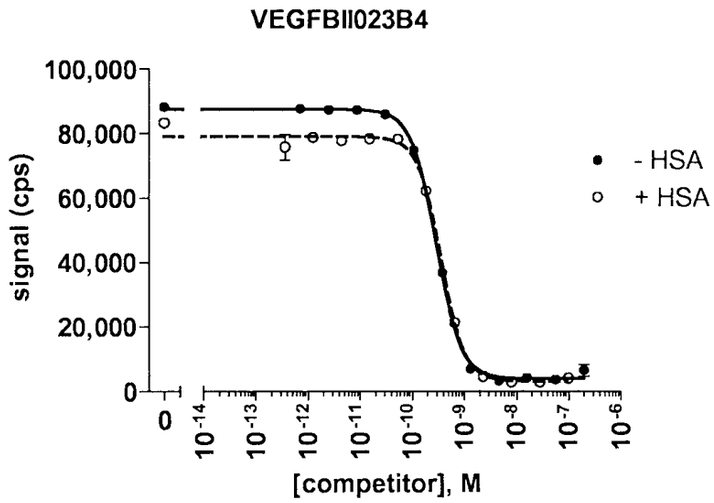
Fig. 40

VHH ID	Format	description
VEGFDLLBII010		VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8-*9gs*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII011		VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8-9gs-DLLBII136C07
VEGFDLLBII012		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-DLLBII136C07
VEGFDLLBII013		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII014		VEGFBII23B04-*9gs*-5B5-*35gs,cys15*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII015		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-5B05-*35gs*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII016		VEGFBII23B04-*35gs*-DLLBII129B05-*9gs*-ALB8

Legend:

Nanobody or linker	description
	DLLBII129B05
	DLLBII136C07
	VEGFBII23B04
	5B05
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

Fig. 41-1


VEGFBII023B4
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

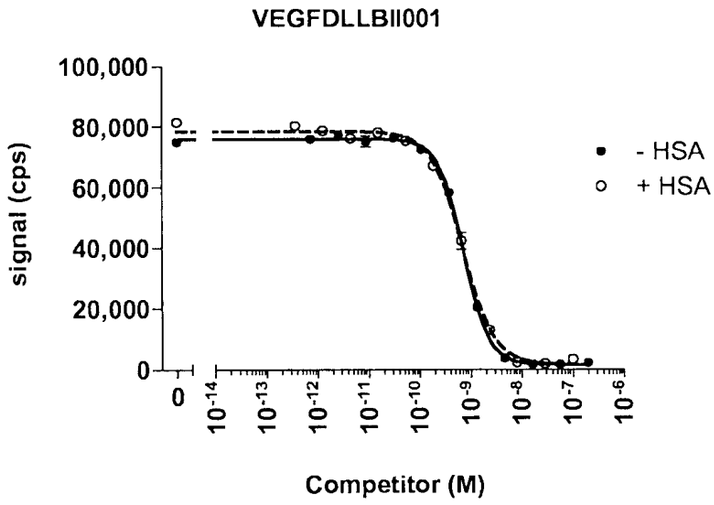
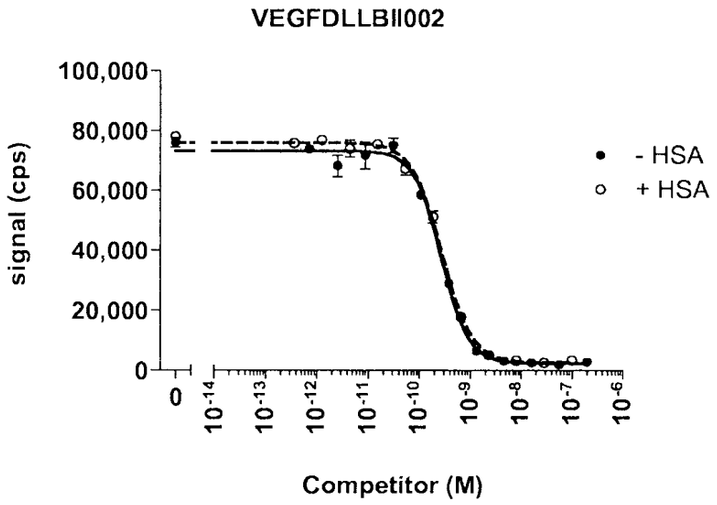
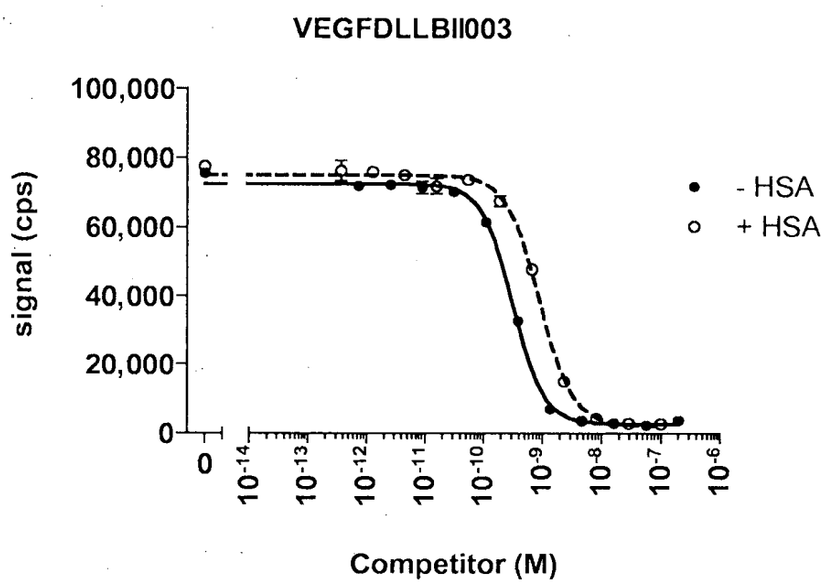

VEGFDLLBII001
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competitor (M)

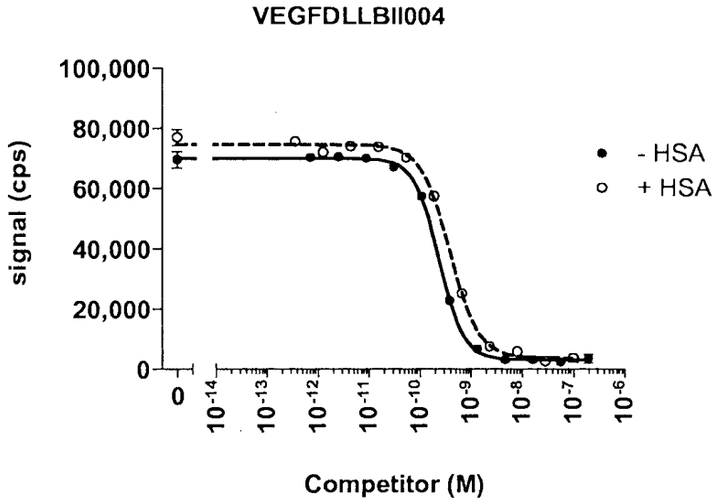
Fig. 41-2


VEGFDLLBII002
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competitor (M)


VEGFDLLBII003
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competitor (M)

142

Fig. 41-3


VEGFDLLBII004
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competitor (M)

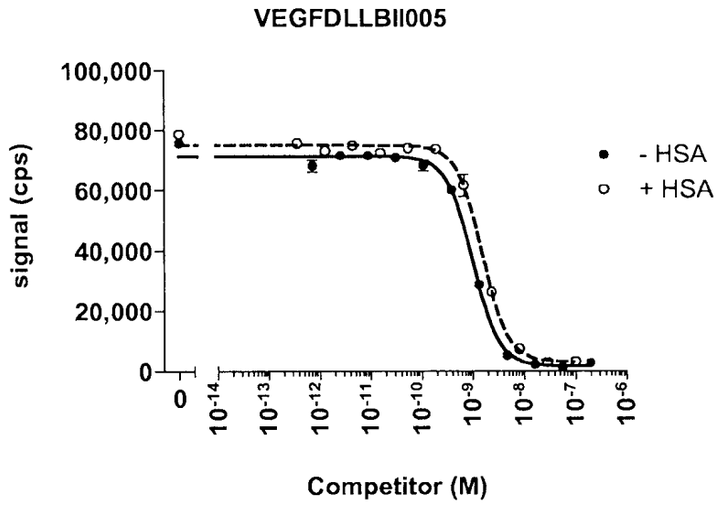

VEGFDLLBII005
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competitor (M)

Fig. 41-4

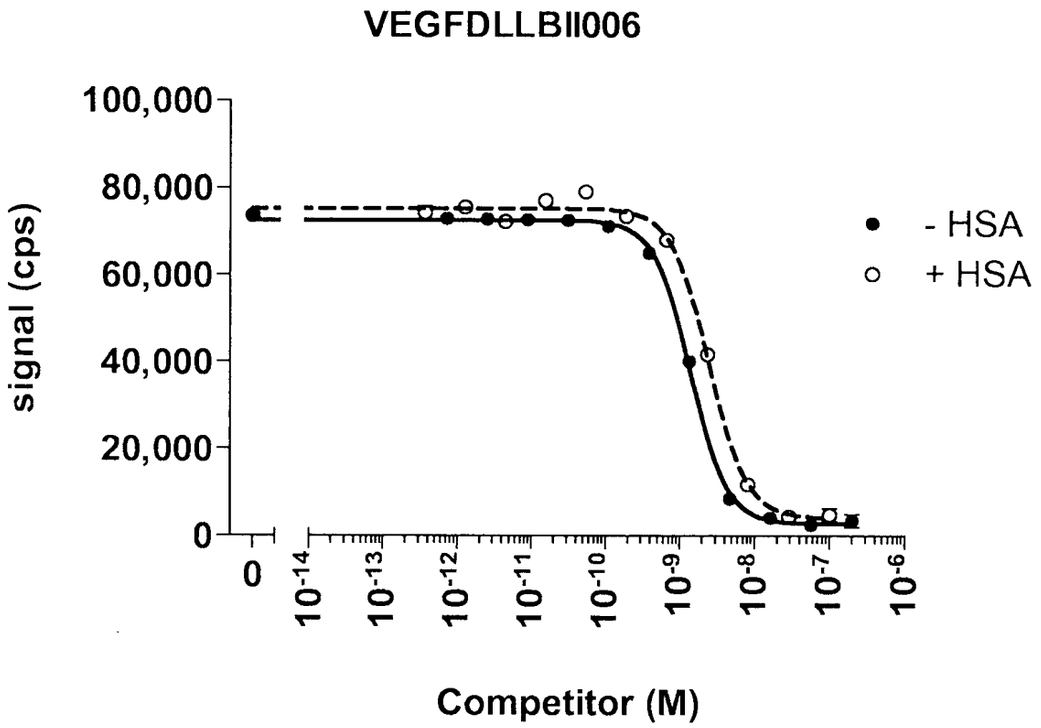
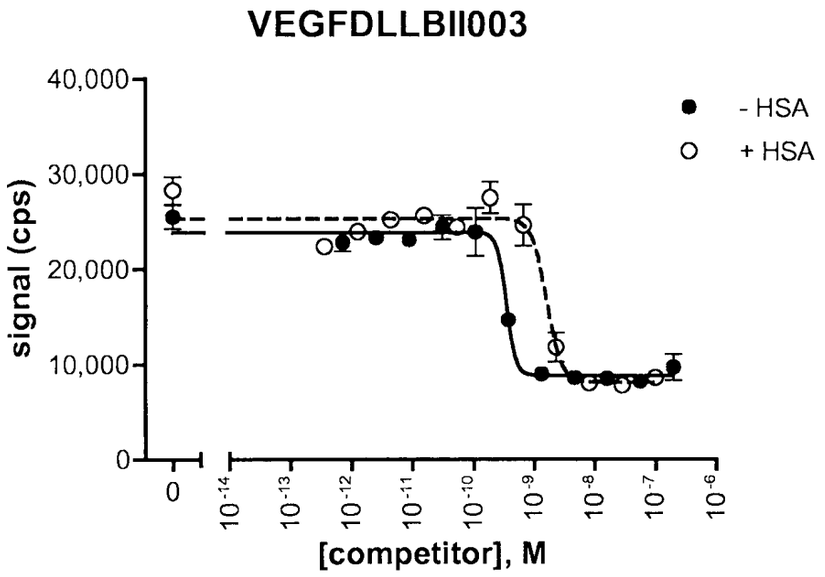

VEGFDLLBII006
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competitor (M)

Fig. 42-1


VEGFDLLBII003
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

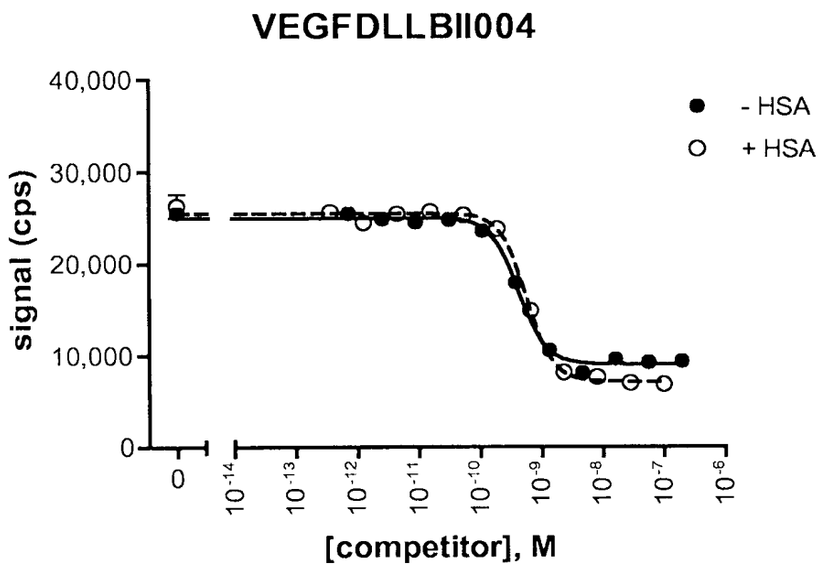
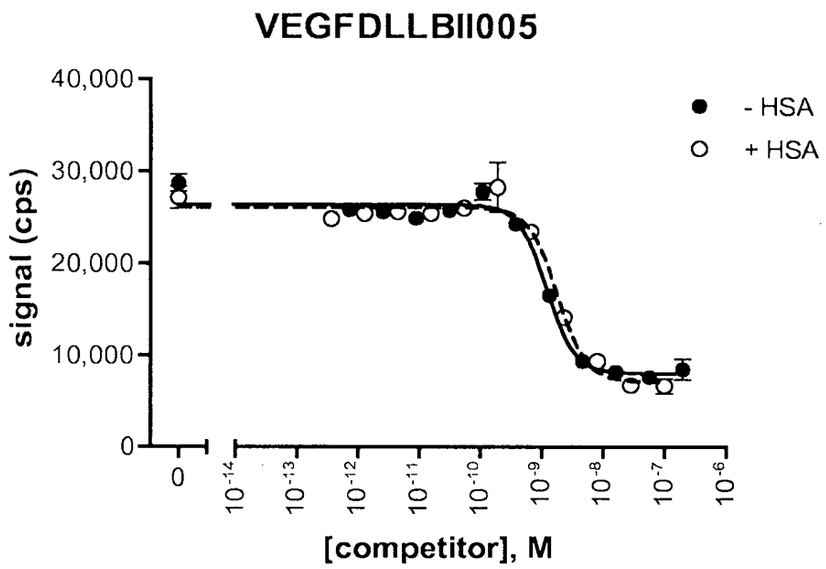
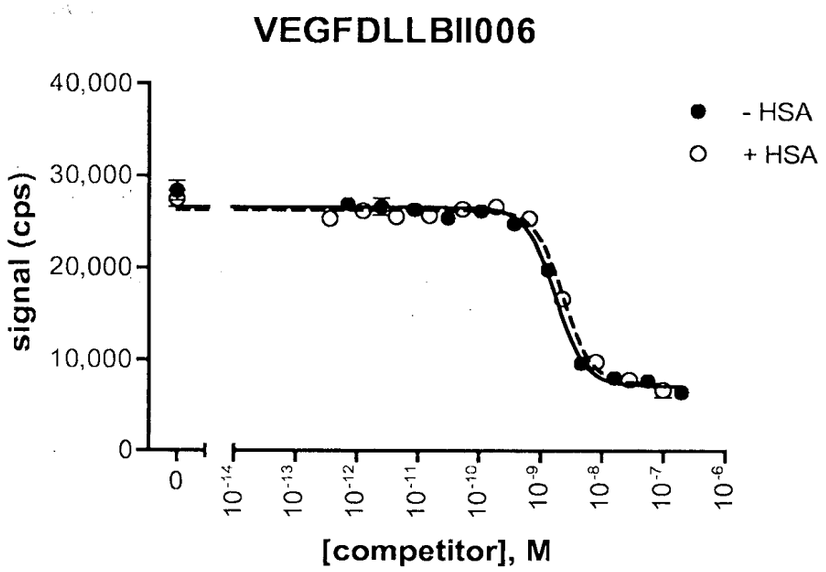

VEGFDLLBII004
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

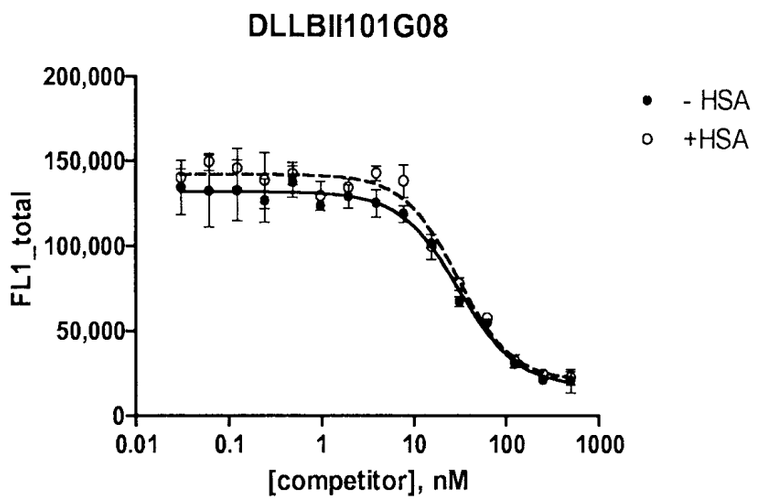
Fig. 42-2


VEGFDLLBII005
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M


VEGFDLLBII006
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

150

Fig. 43-1


DLLBII101G08
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
- HSA
+HSA

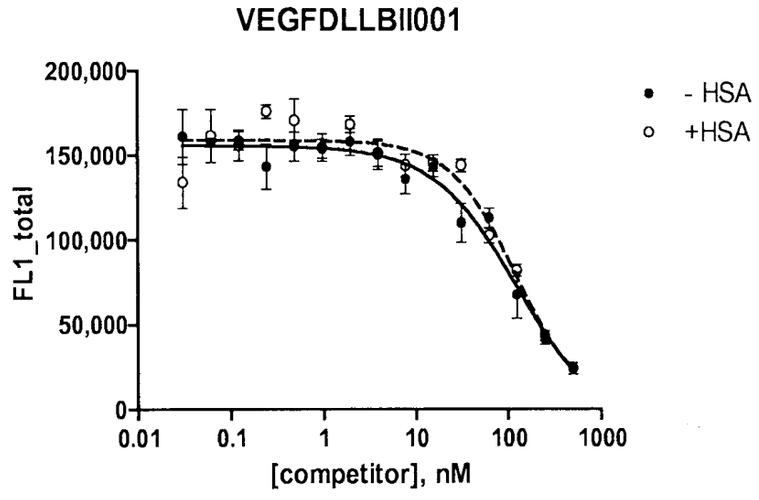
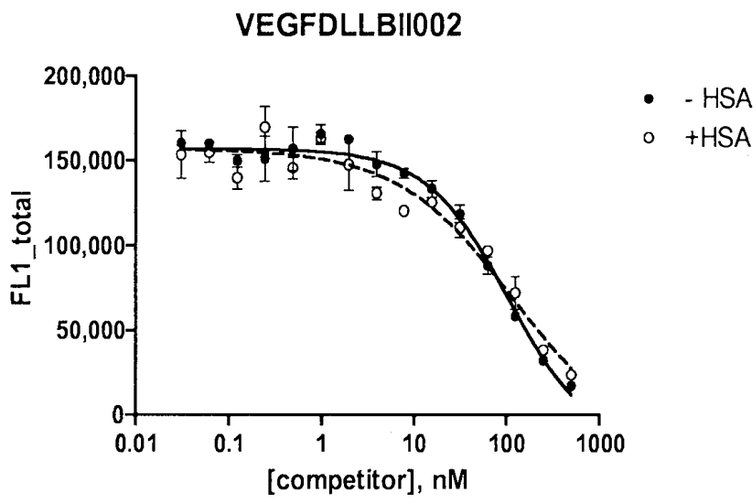
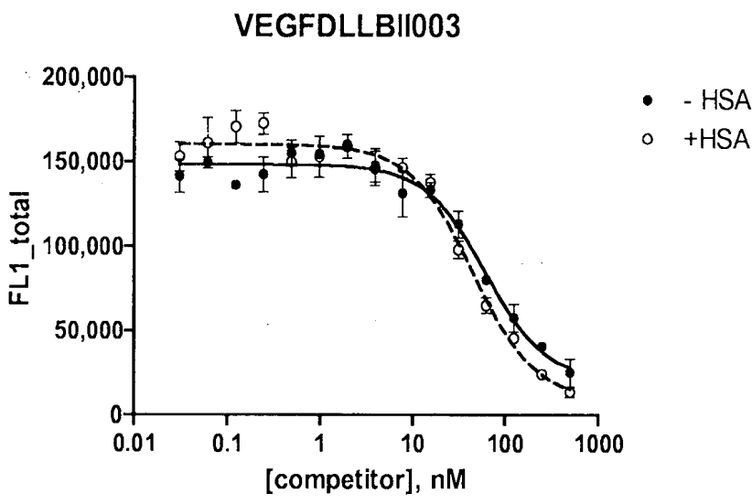

VEGFDLLBII001
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
- HSA
+HSA

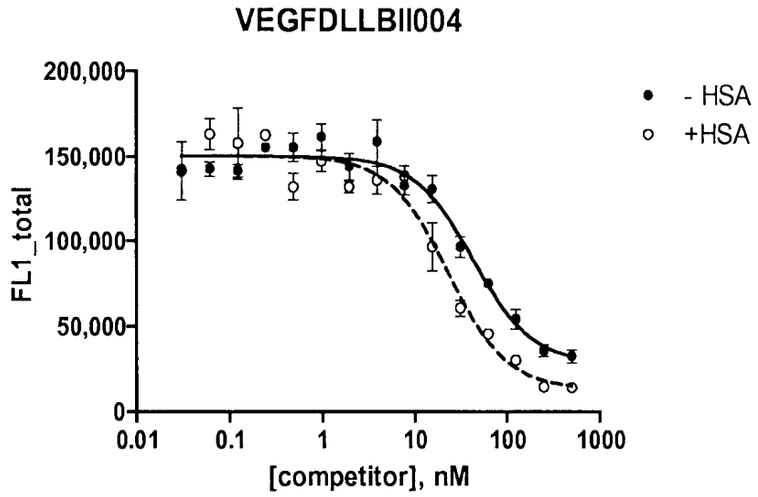
Fig. 43-2





151
156

Fig. 43-3


VEGFDLLBII004
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
- HSA
+HSA

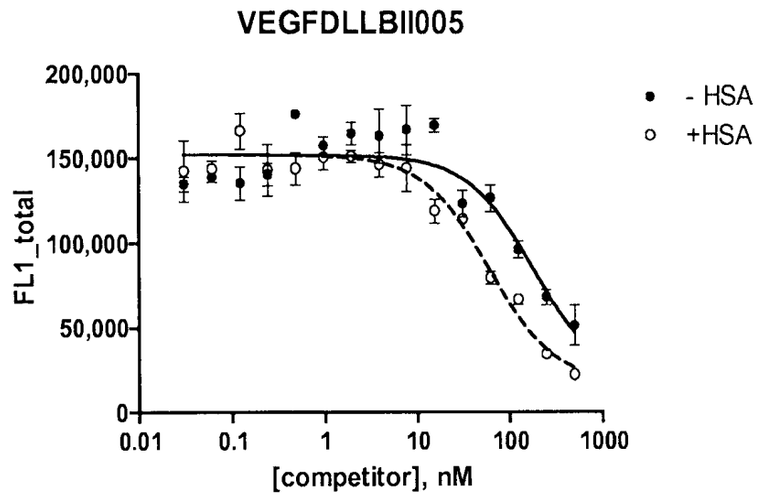

VEGFDLLBII005
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
- HSA
+HSA

Fig. 43-4

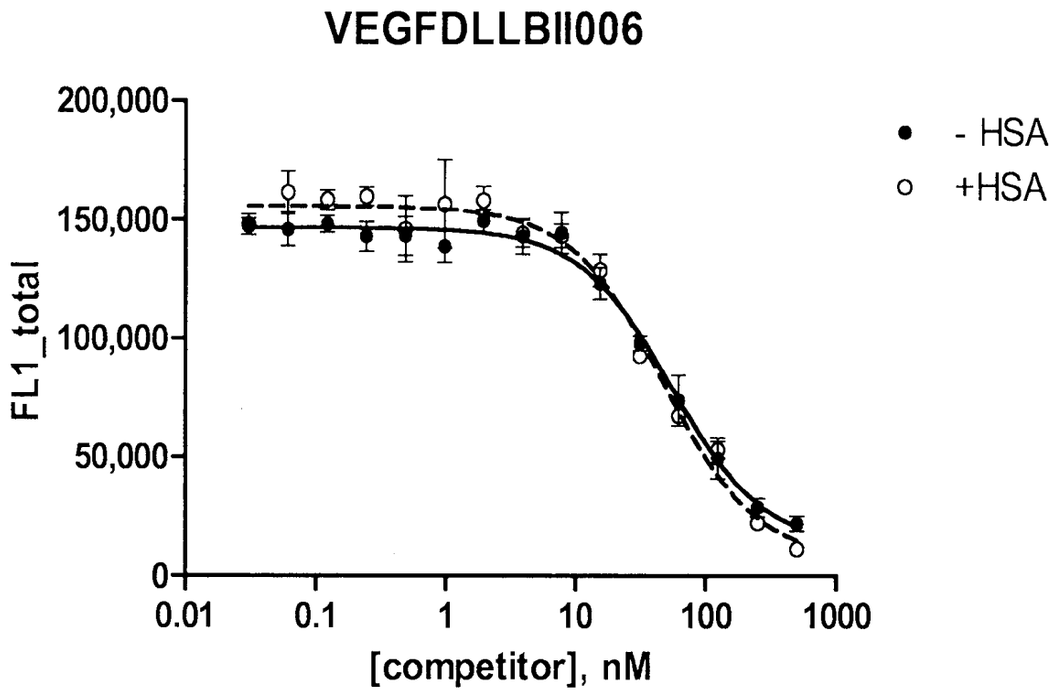
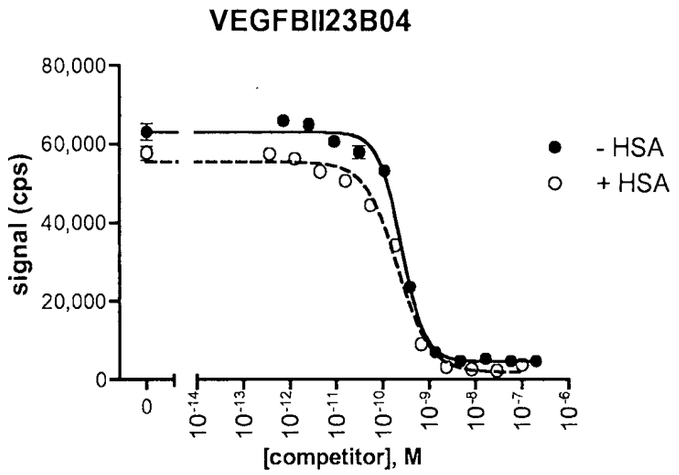

VEGFDLLBII006
200,000
150,000
100,000
50,000
0
FL1_total
0.01
0.1
1
10
100
1000
[competitor], nM
- HSA
+HSA

Fig. 44-1


VEGFBII23B04
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

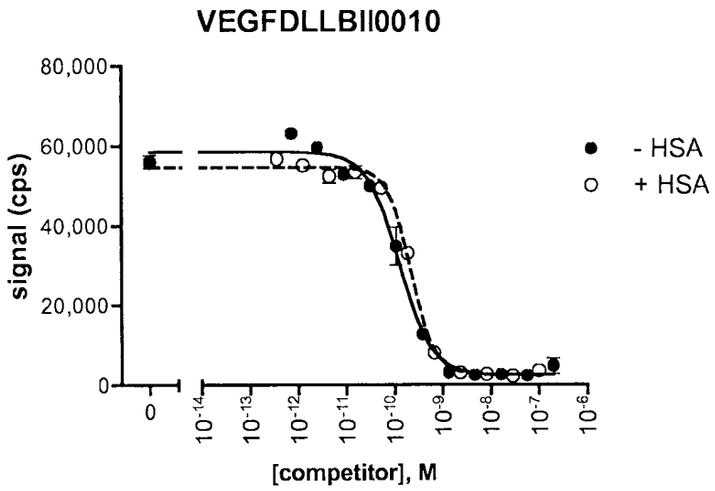
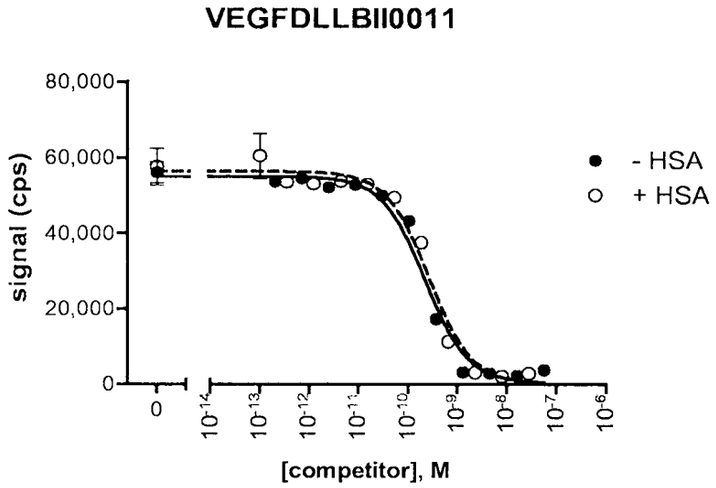

VEGFDLLBII0010
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

Fig. 44-2


VEGFDLLBII0011
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

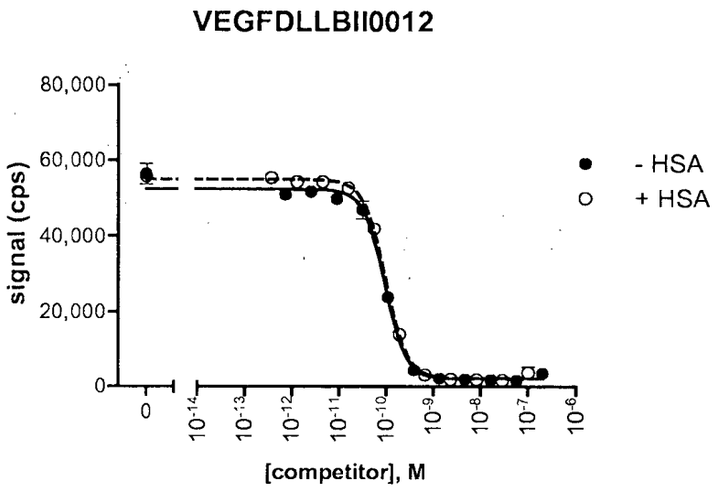
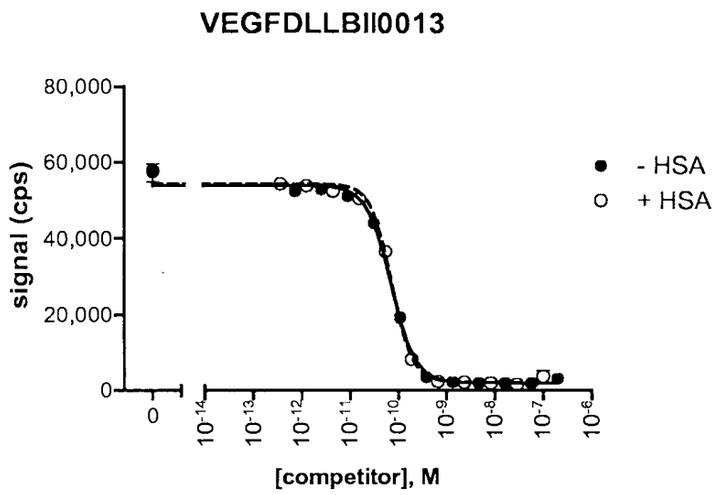

VEGFDLLBII0012
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

Fig. 44-3


VEGFDLLBII0013
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

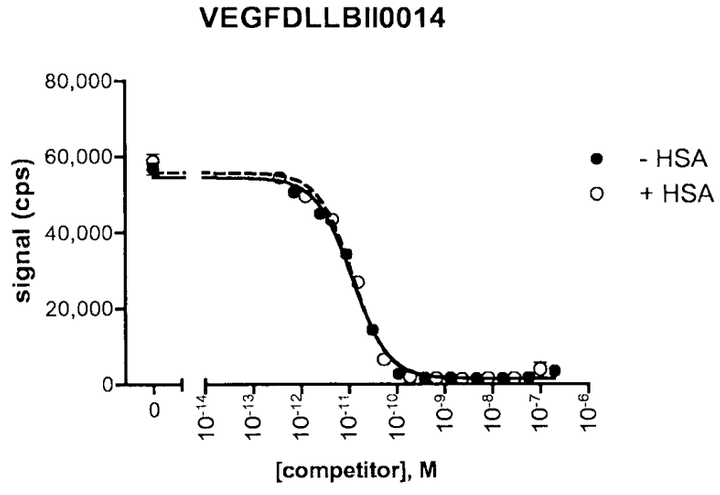
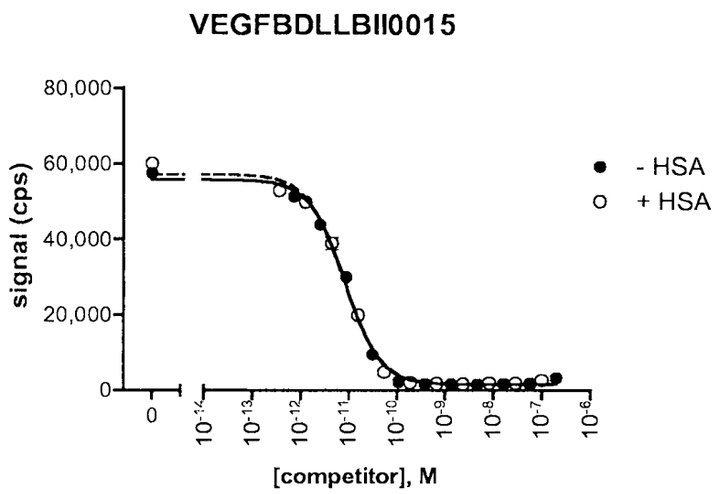

VEGFDLLBII0014
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

Fig. 44-4


VEGFBDLLBII0015
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

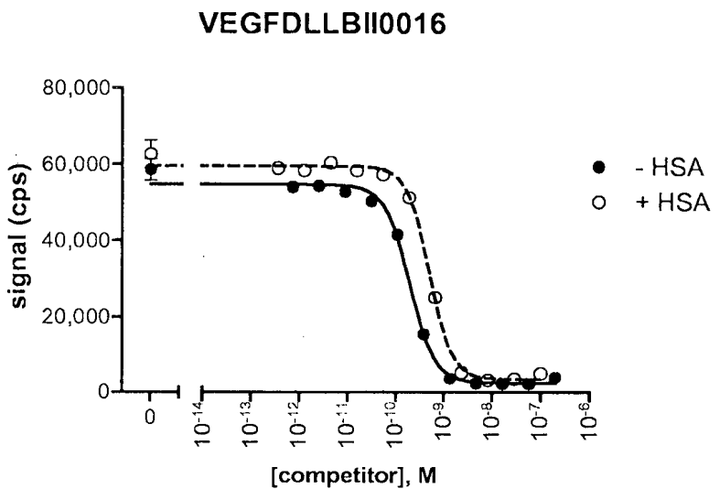
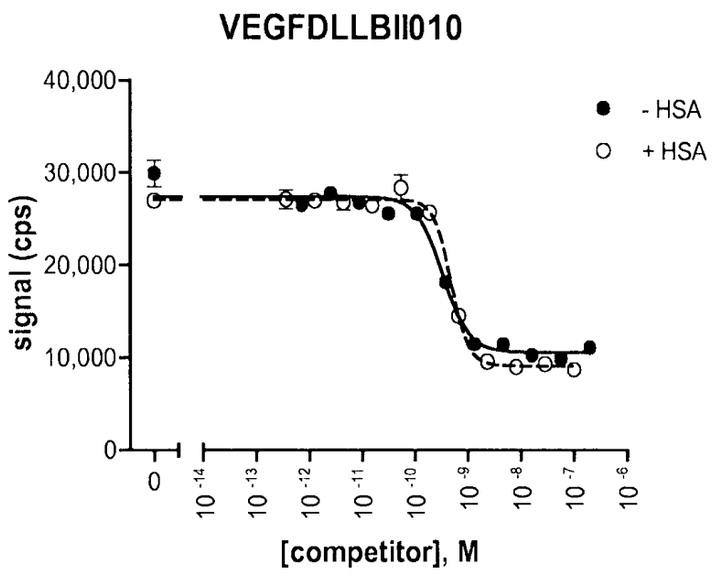

VEGFDLLBII0016
80,000
60,000
40,000
20,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

Fig. 45-1


VEGFDLLBII010
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10 -14
10 -13
10 -12
10 -11
10 -10
10 -9
10 -8
10 -7
10 -6
[competitor], M

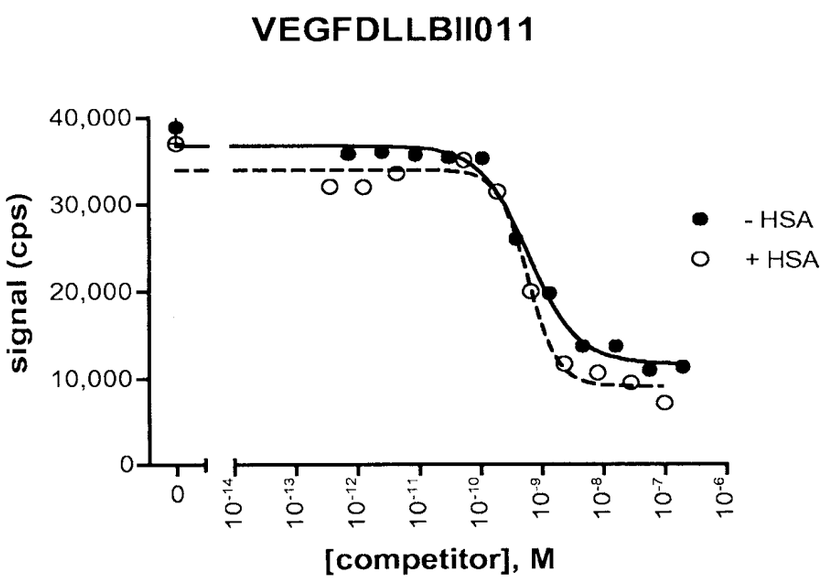

VEGFDLLBII011
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

Fig. 45-2

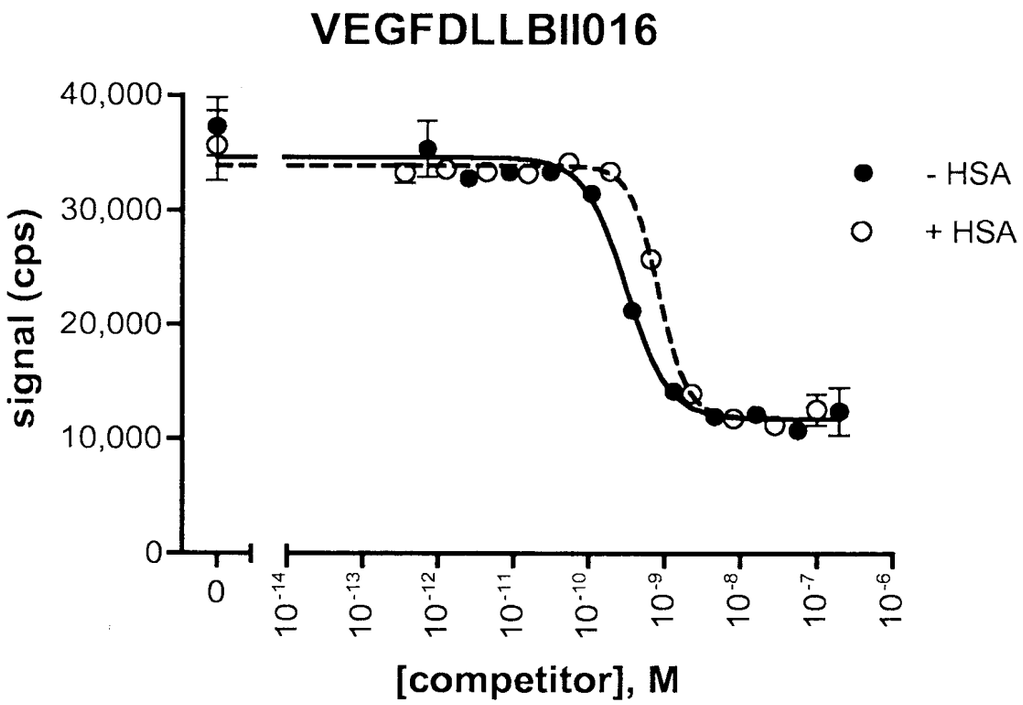
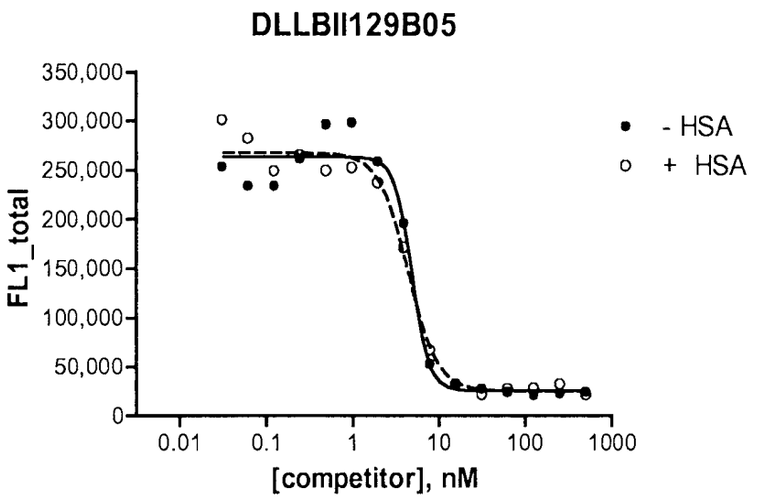

VEGFDLLBII016
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competitor], M

Fig. 46-1

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT

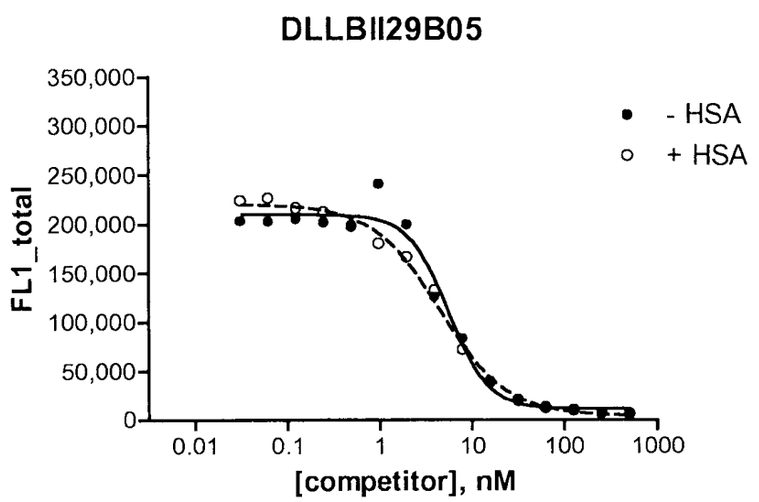
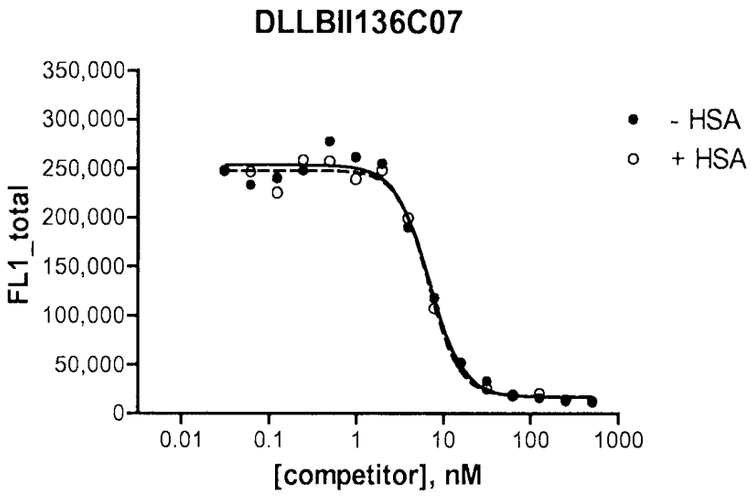
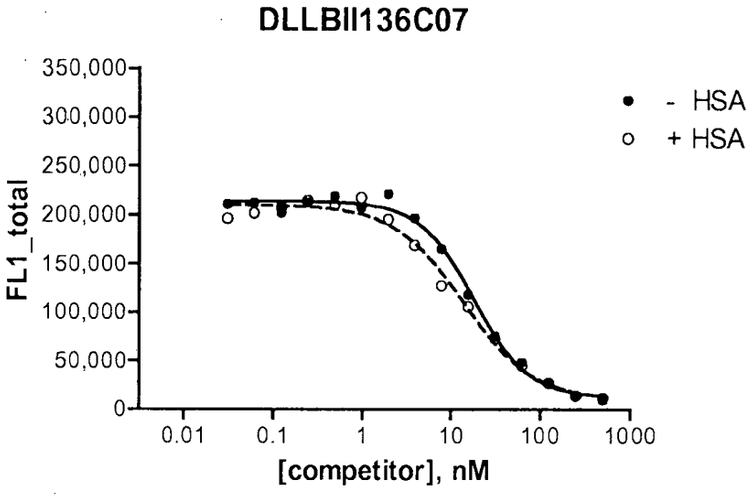


Fig. 46-2

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



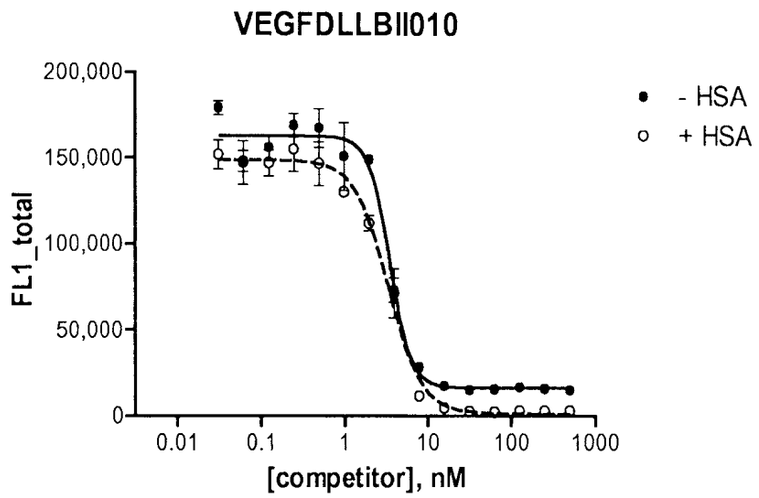
CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT



156
154
155

Fig. 46-3

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT

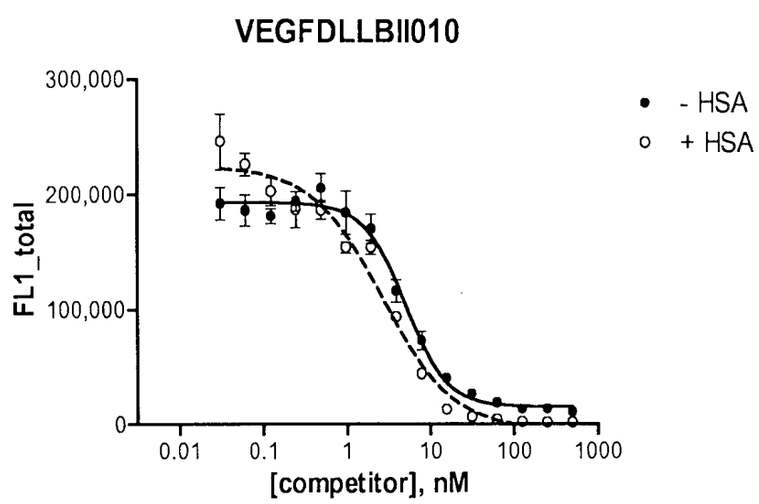
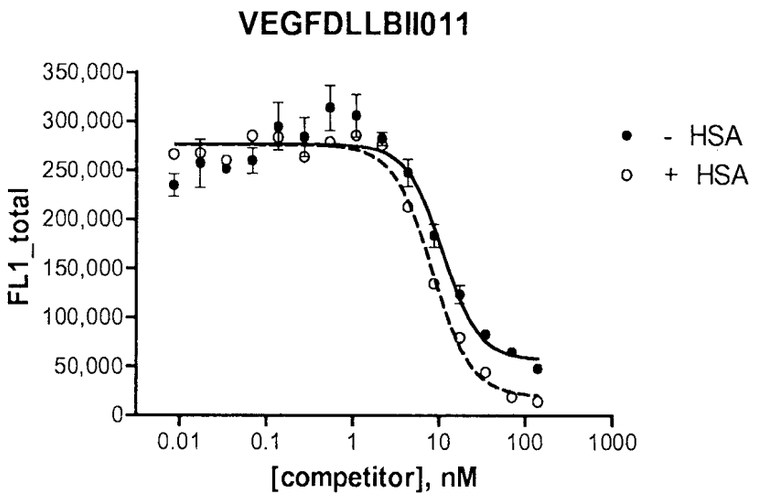
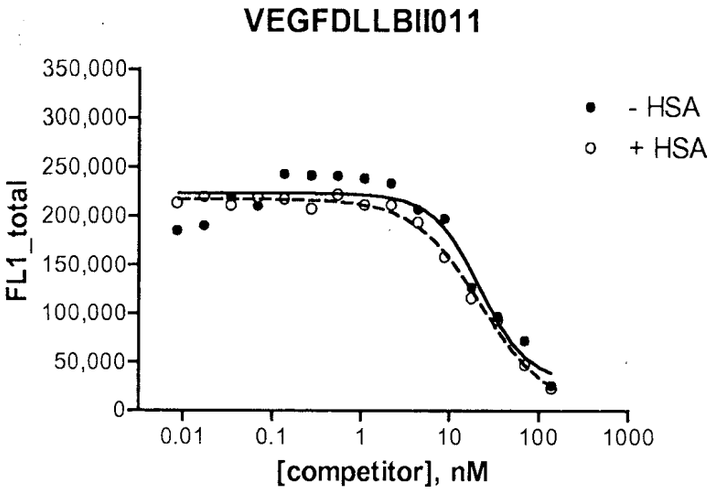


Fig. 46-4

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



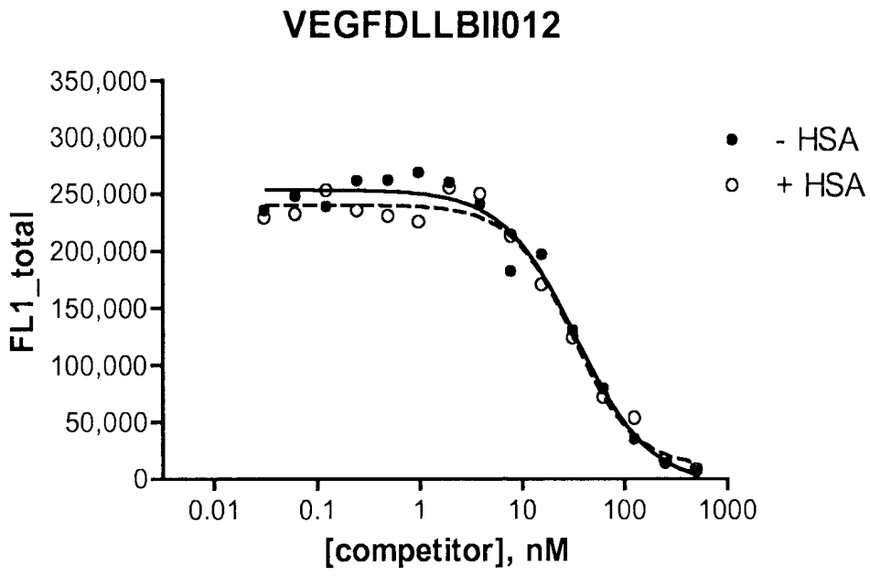
CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT



152
156

Fig. 46-5

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT

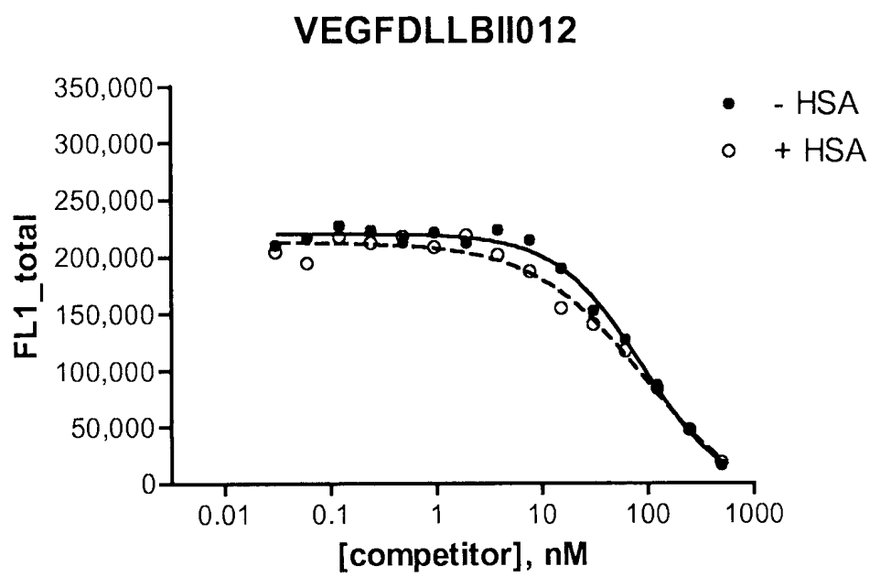
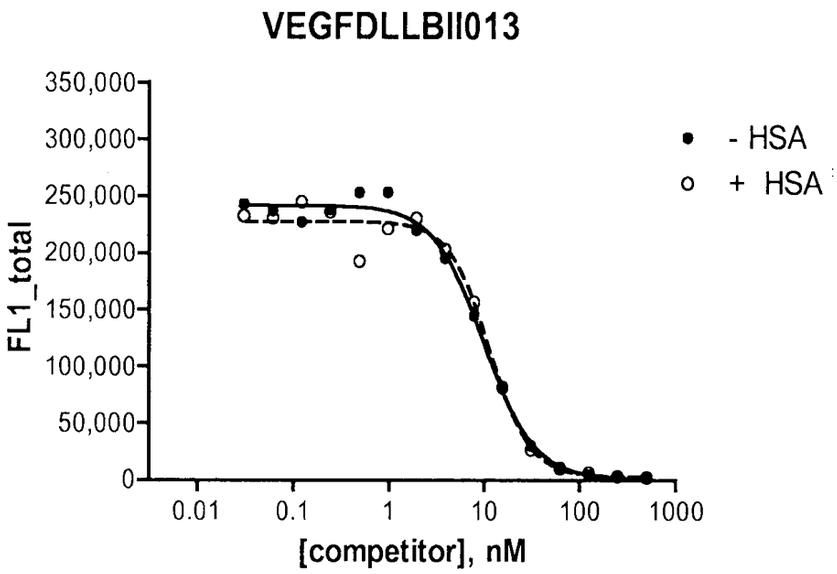
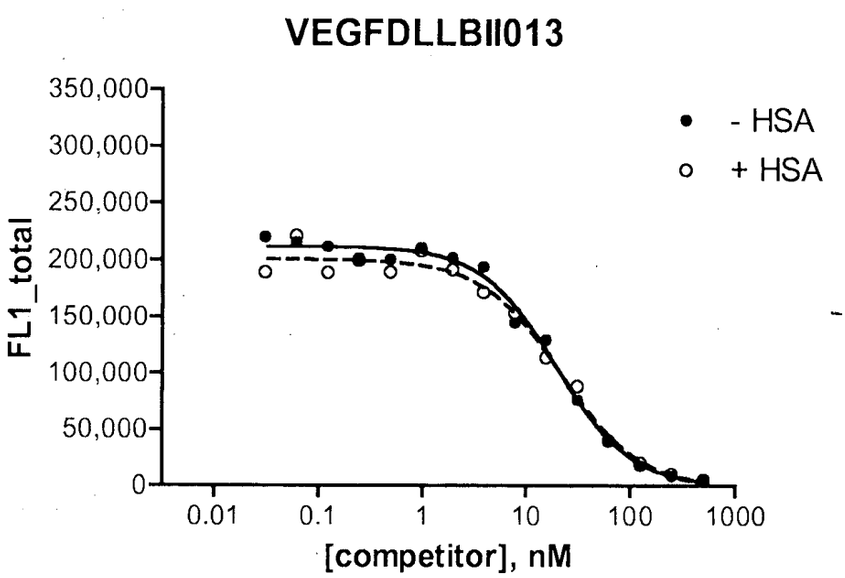


Fig. 46-6

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



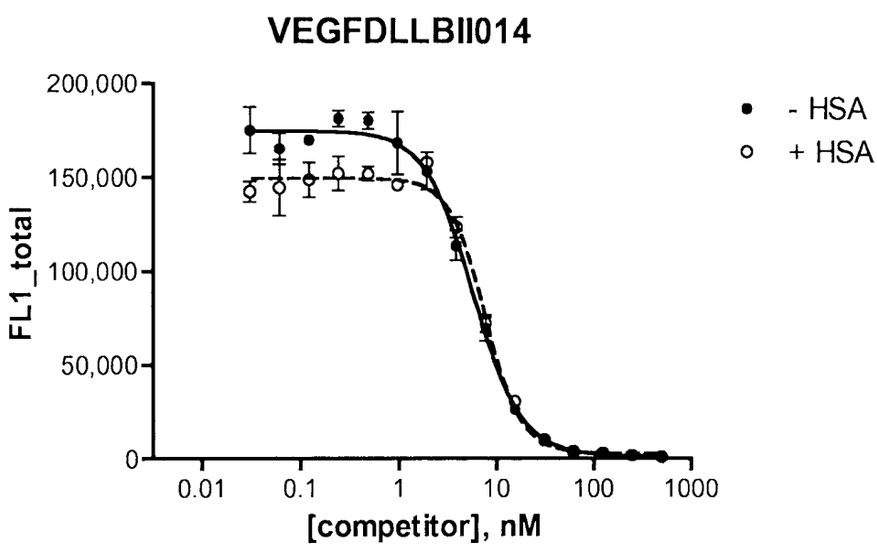
CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT



158

Fig. 46-7

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT

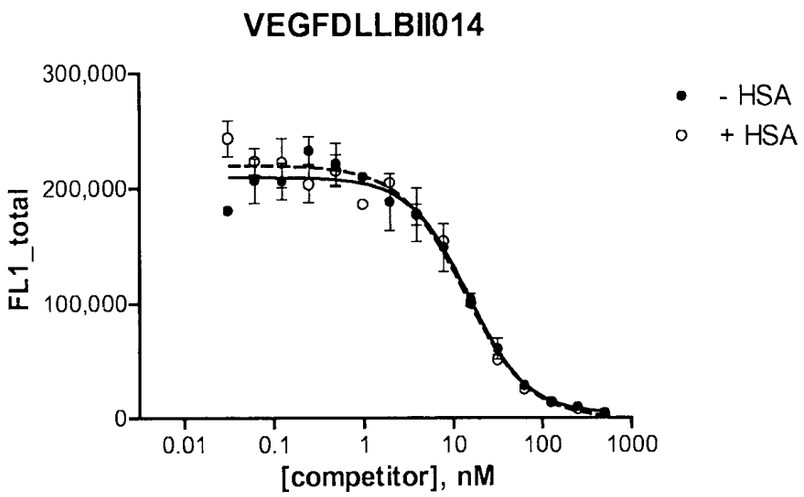
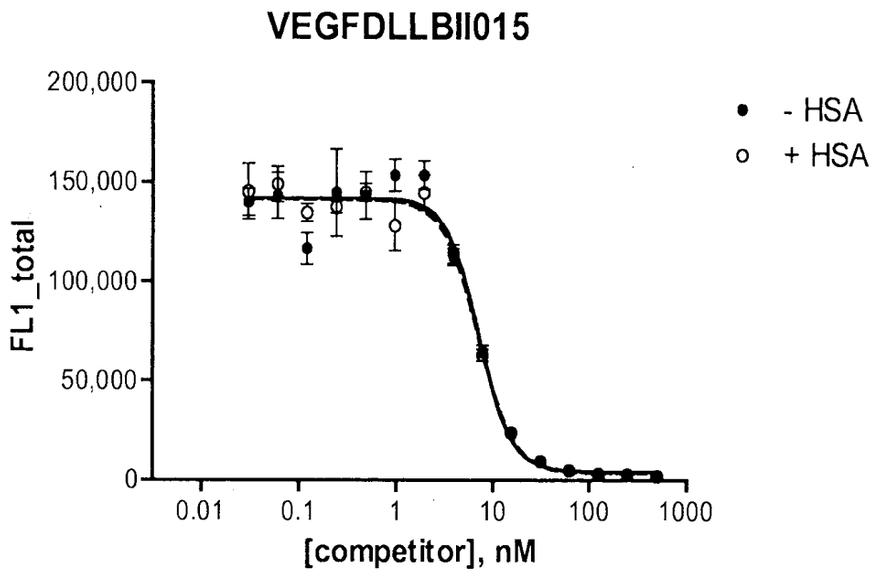
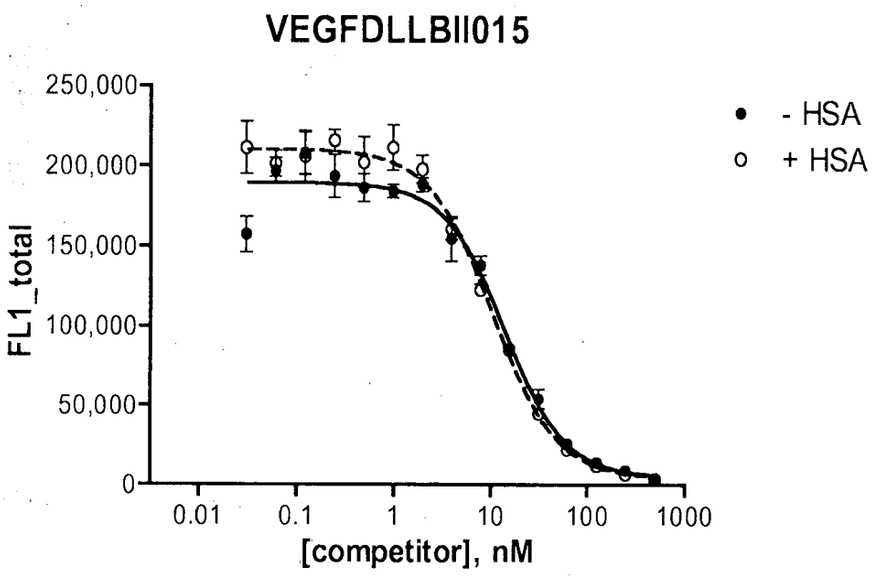


Fig. 46-8

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



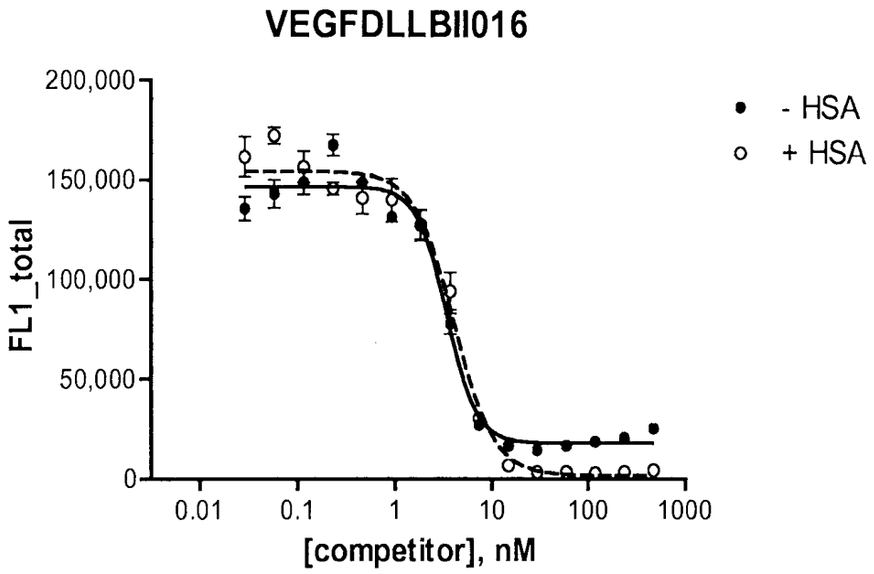
CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT



159

Fig. 46-9

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT

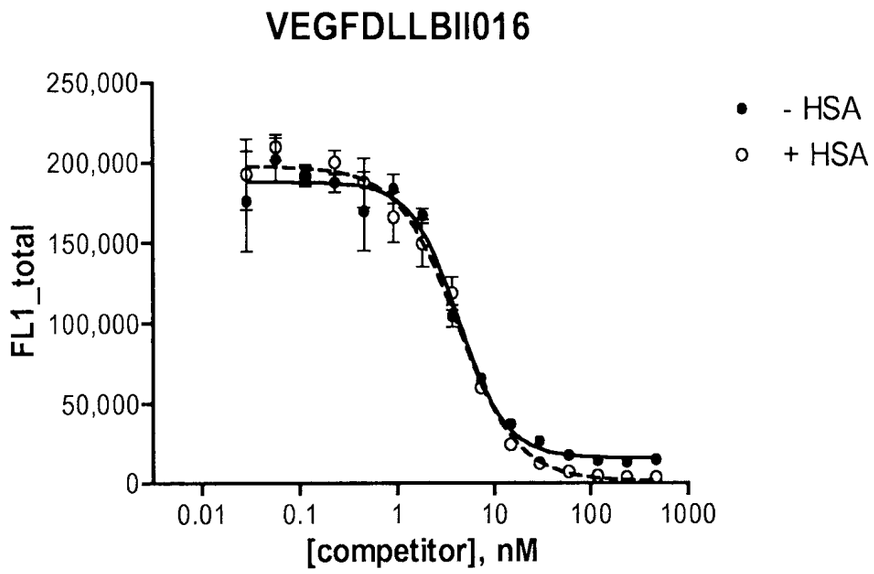
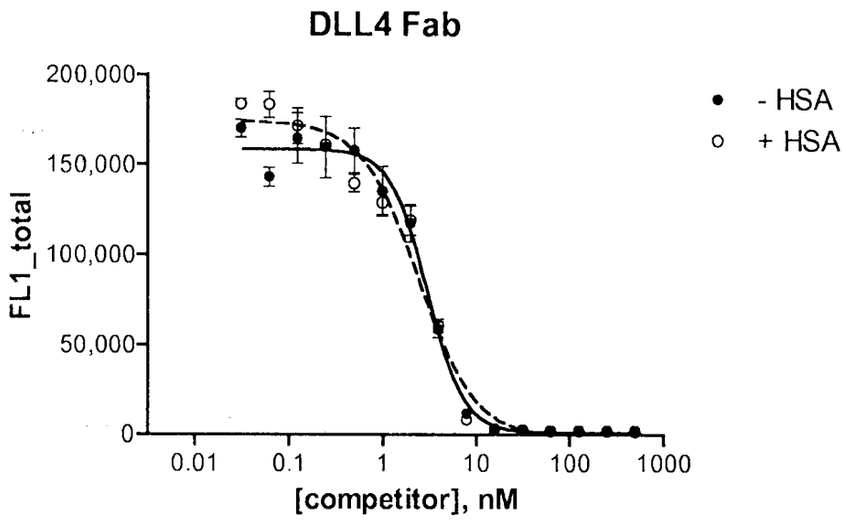
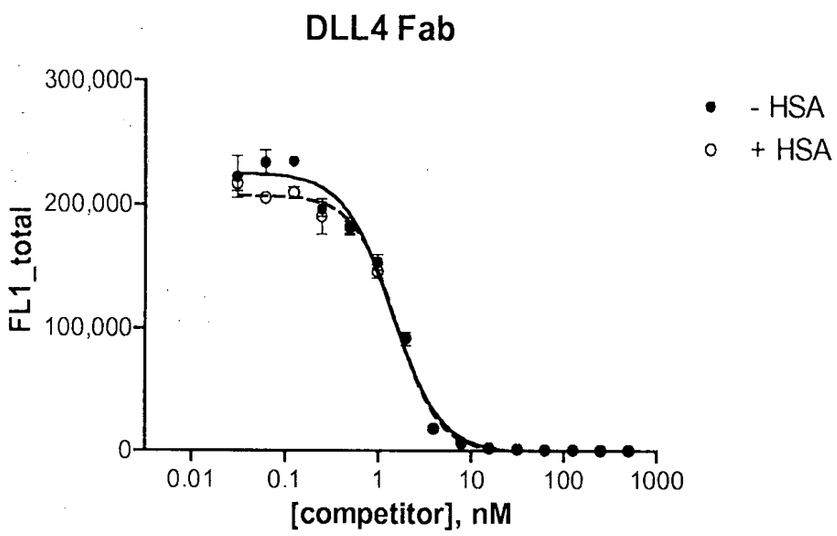


Fig. 46-10

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT

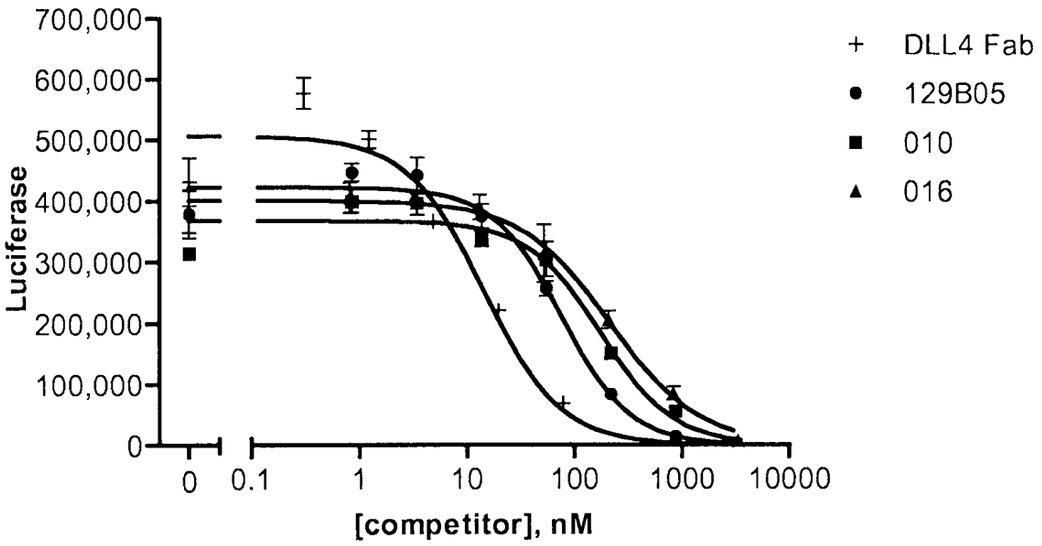


CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT



160
451

Fig. 47-1


700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
Luciferase
0
0.1
1
10
100
1000
10000
[competitor], nM
+ DLL4 Fab
● 129B05
■ 010
▲ 016

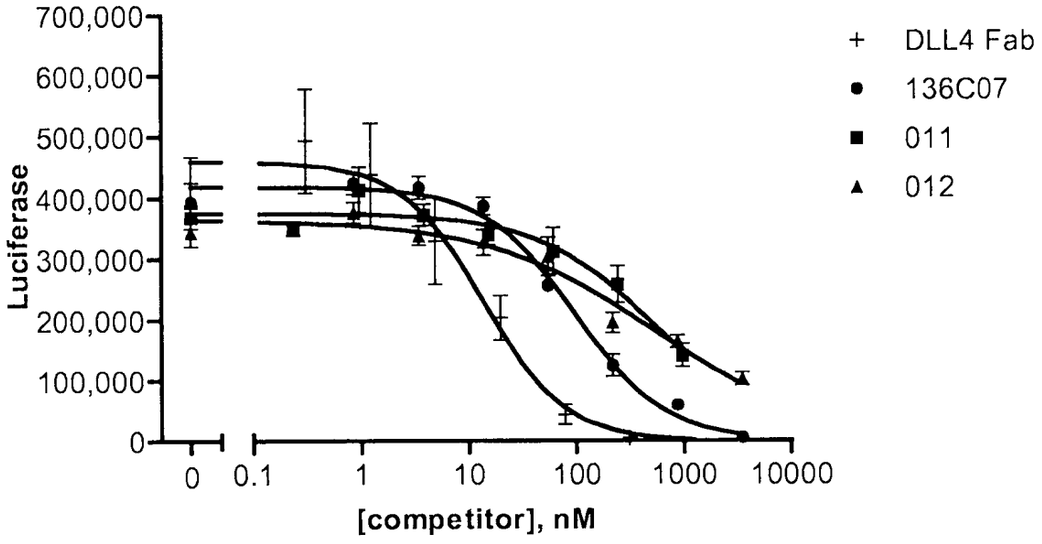
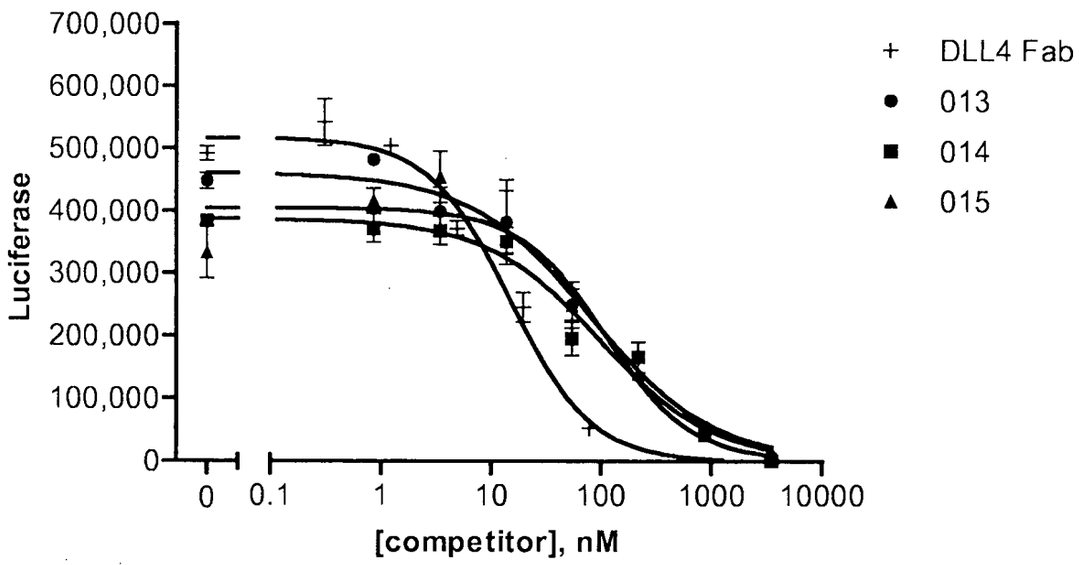
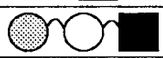
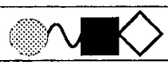
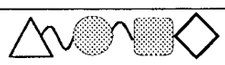
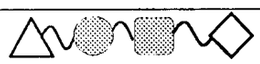

700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
Luciferase
0
0.1
1
10
100
1000
10000
[competitor], nM
+ DLL4 Fab
● 136C07
■ 011
▲ 012

Fig. 47-2


700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
Luciferase
0
0.1
1
10
100
1000
10000
[competitor], nM
+ DLL4 Fab
● 013
■ 014
▲ 015

IC 1

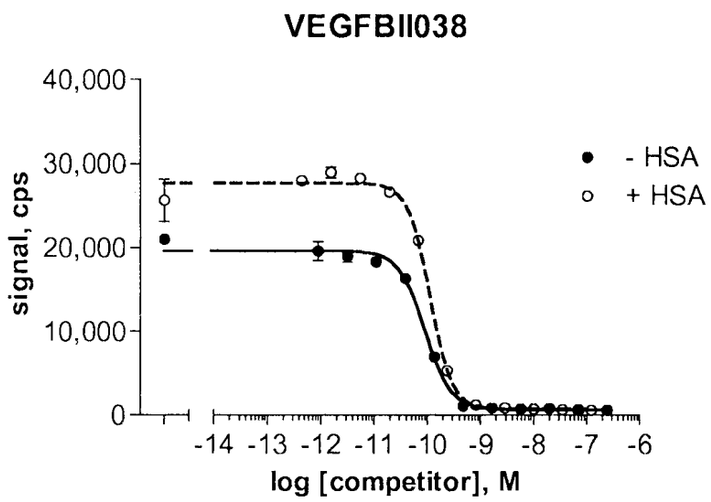
Fig. 48

VHH ID	Format	description
A1		VEGFBII038-*35gs,cys15*-DLLBII018
A2		VEGFBII038-*9gs*-ALB8-*9gs*-DLLBII018
A3		VEGFBII038-*35gs,cys15*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018
HSA1		VEGFBII038-*35gs*-DLLBII018-HSA
HSA2		VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018-HSA
HSA3		DLLBII039-*35gs*-VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-HSA
HSA4		VEGFBII038-*35gs*-DLLBII018-*35gs*-HSA
HSA5		VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018-*35gs*-HSA
HSA6		DLLBII039-*35gs*-VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-HSA

Legend:

Nanobody, linker or HSA	description
	DLLBII018
	DLLBII039
	VEGFBII038
	VEGFBII032
	HSA
	ALB8
	*9gs* linker
	*35gs* linker
	PEGylated *35gs,cys15* linker

Fig. 49-1


VEGFBII038
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal, cps
- HSA
+ HSA
-14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M

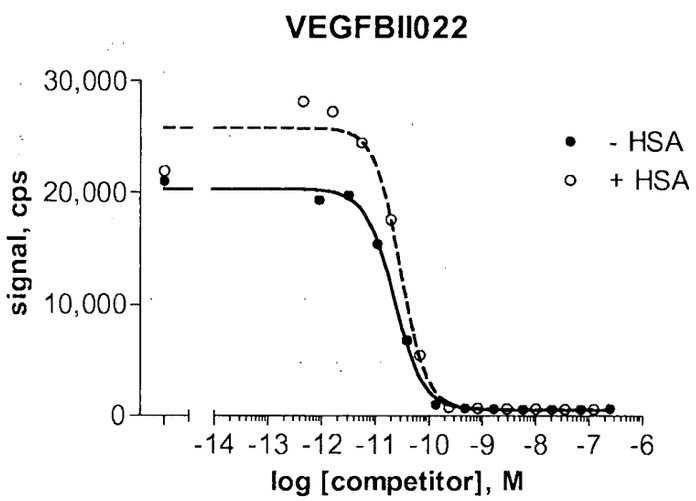

VEGFBII022
30,000
20,000
10,000
0
signal, cps
- HSA
+ HSA
-14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M

Fig. 49-2

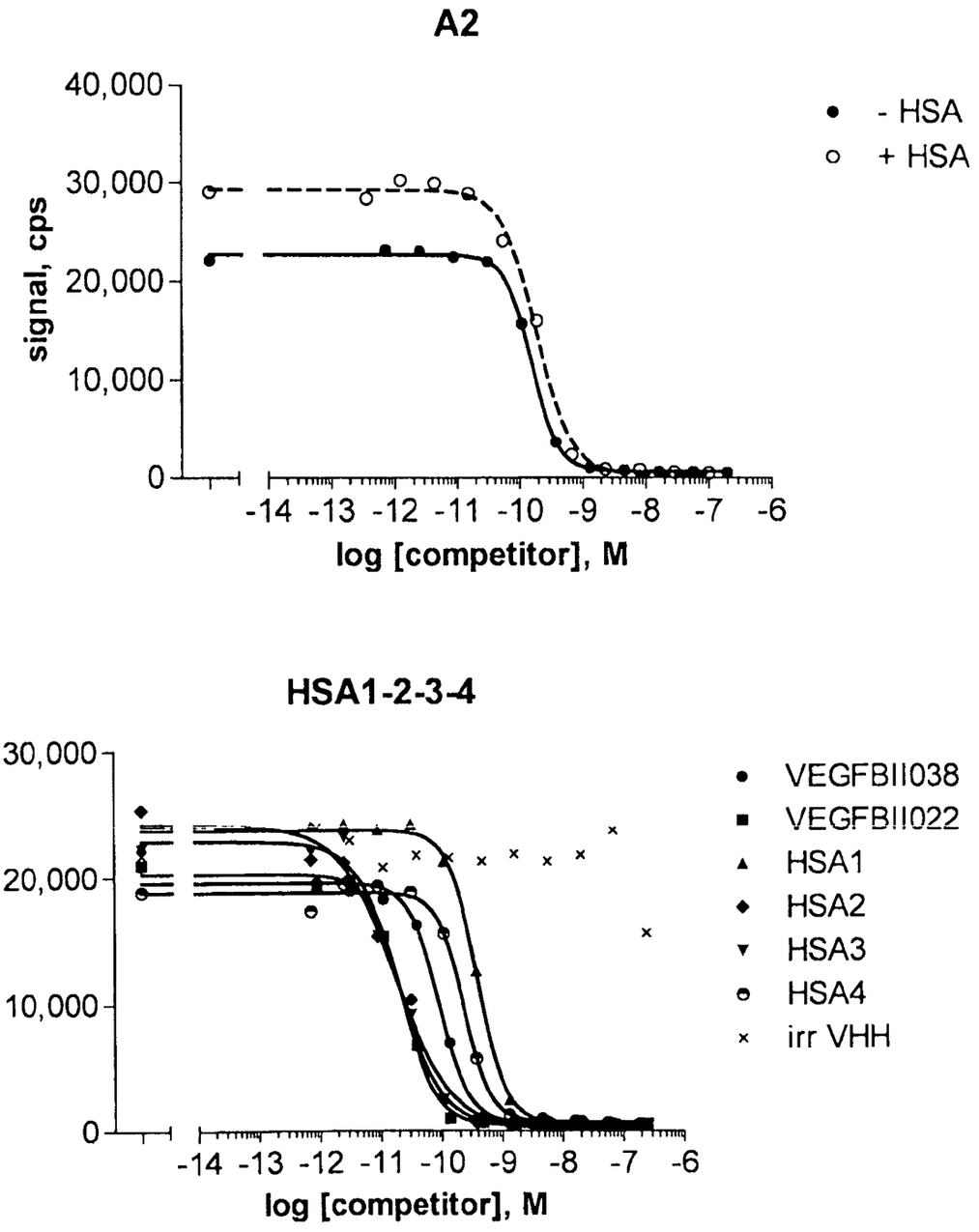
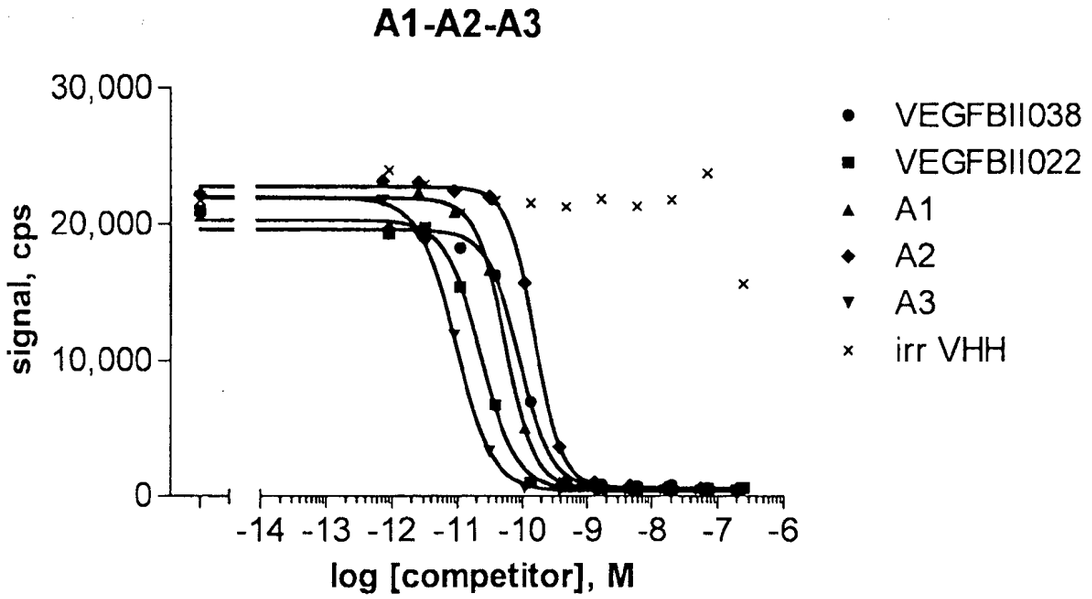
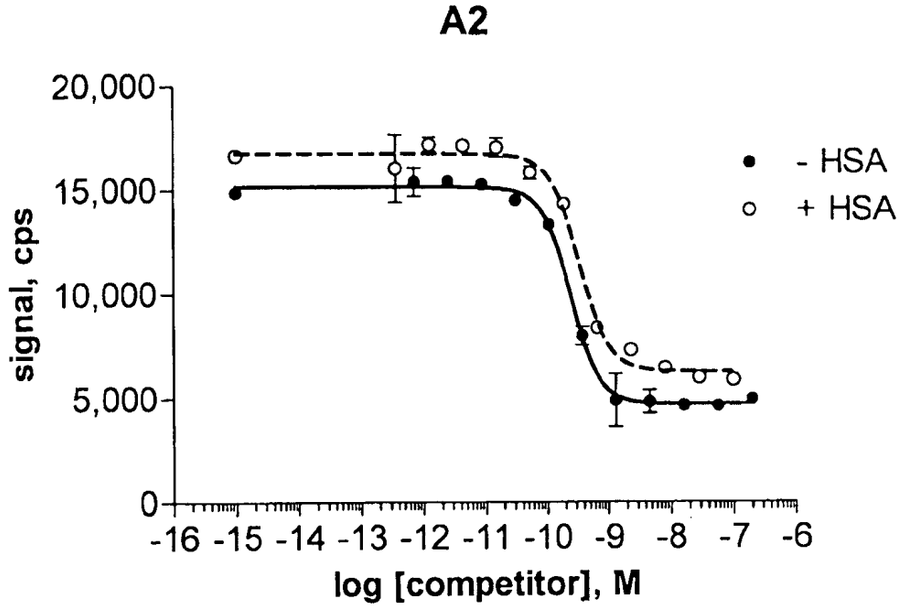

A2
40,000
30,000
20,000
10,000
0
signal, cps
-14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M
- HSA
+ HSA
HSA1-2-3-4
30,000
20,000
10,000
0
signal, cps
-14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M
VEGFBII038
VEGFBII022
HSA1
HSA2
HSA3
HSA4
irr VHH

Fig. 49-3


A1-A2-A3
30,000
20,000
10,000
0
signal, cps
-14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M
VEGFBII038
VEGFBII022
A1
A2
A3
irr VHH

163

Fig. 50-1


A2
20,000
15,000
10,000
5,000
0
signal, cps
- HSA
+ HSA
-16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M

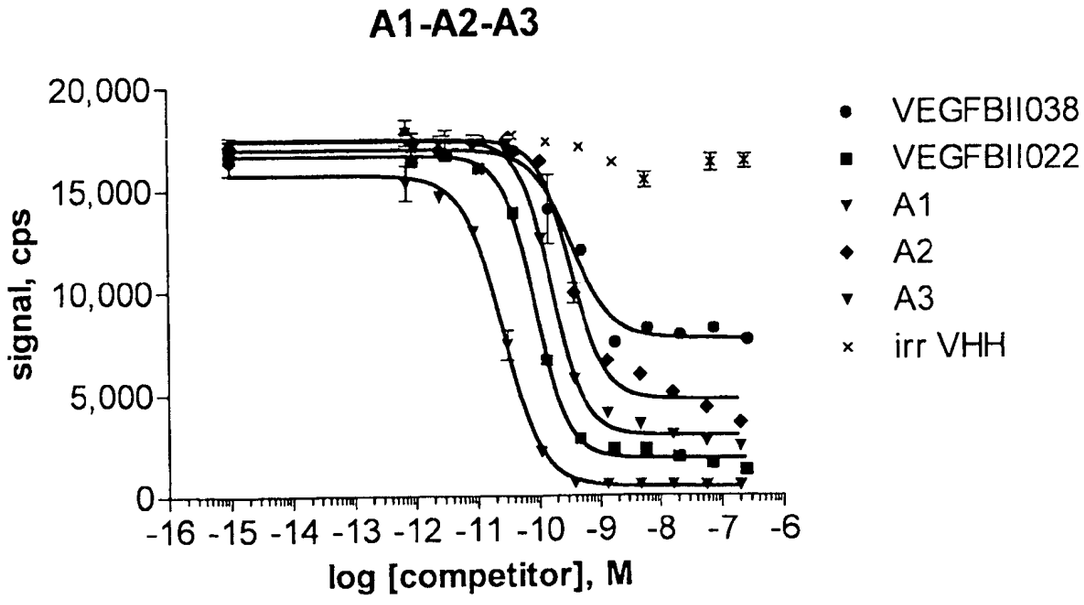
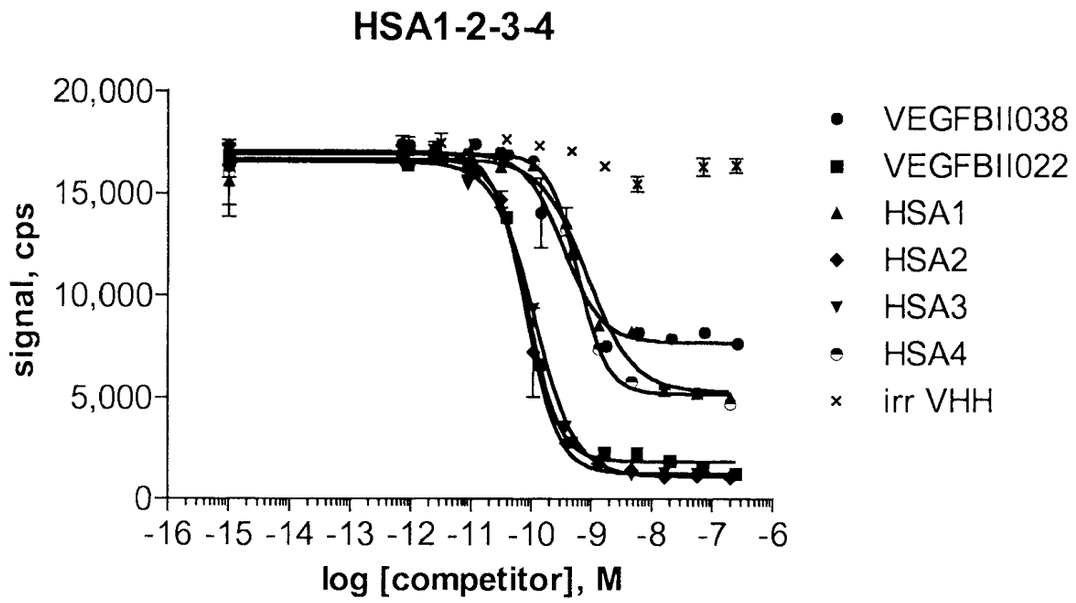

A1-A2-A3
20,000
15,000
10,000
5,000
0
signal, cps
VEGFBII038
VEGFBII022
A1
A2
A3
irr VHH
-16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M

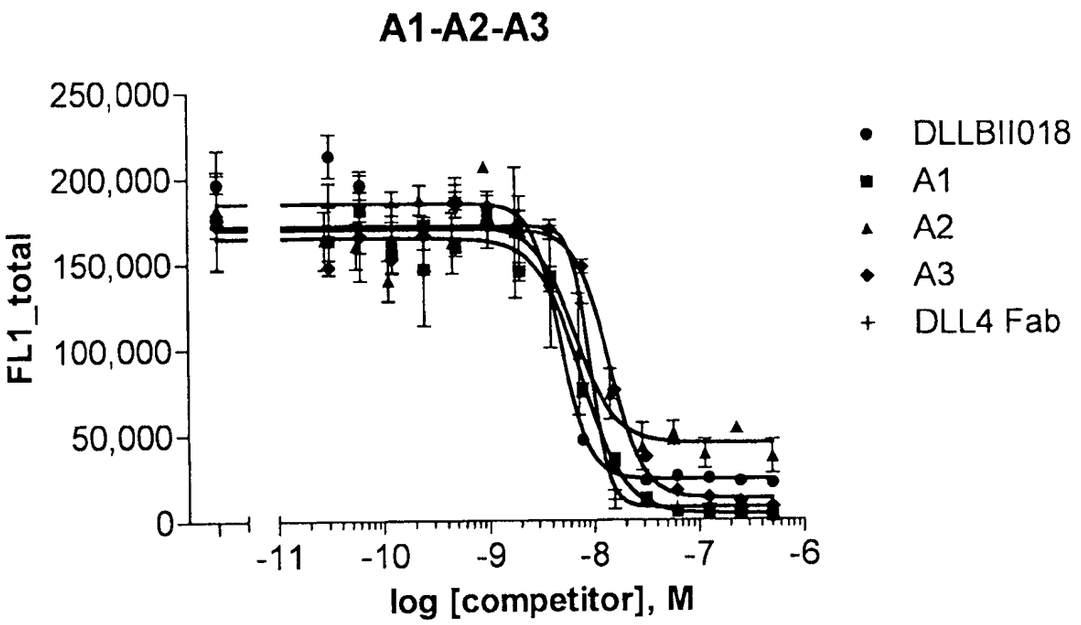
Fig. 50-2


HSA1-2-3-4
20,000
15,000
10,000
5,000
0
signal, cps
-16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competitor], M
VEGFBII038
VEGFBII022
HSA1
HSA2
HSA3
HSA4
irr VHH

164

Fig. 51-1

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT

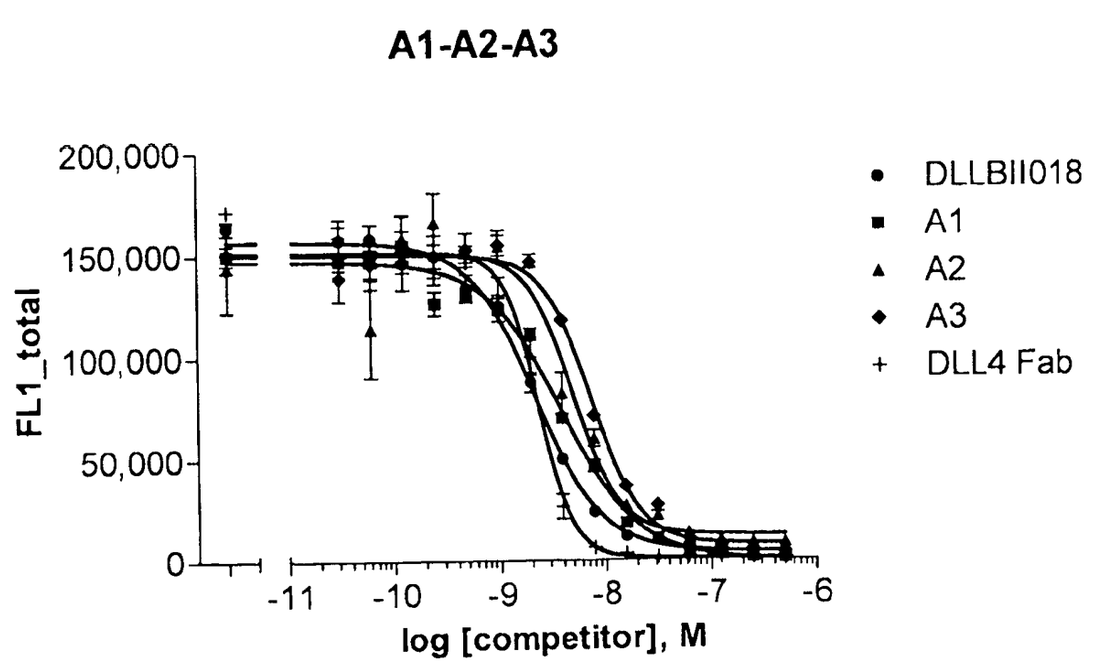
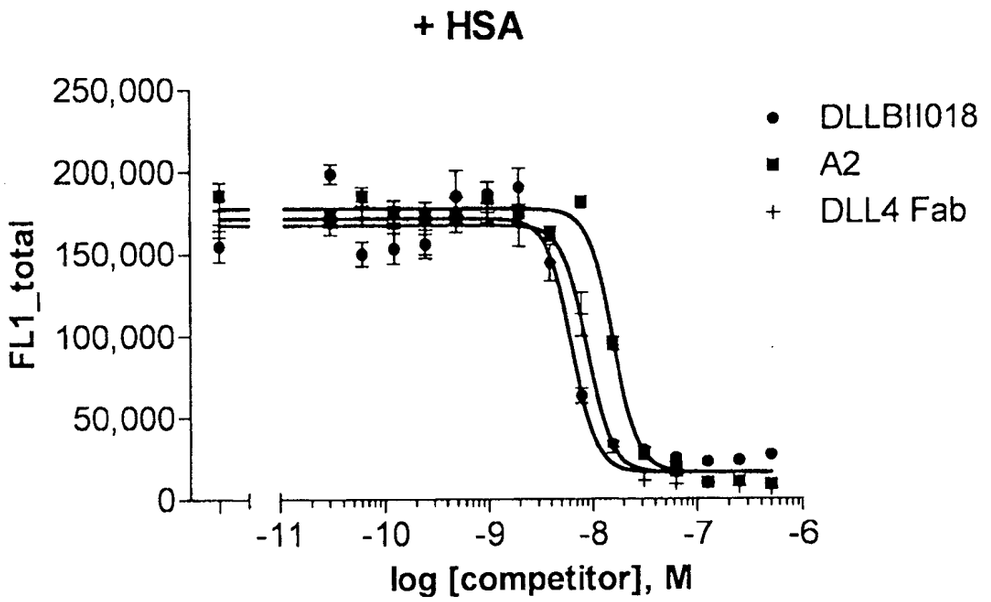
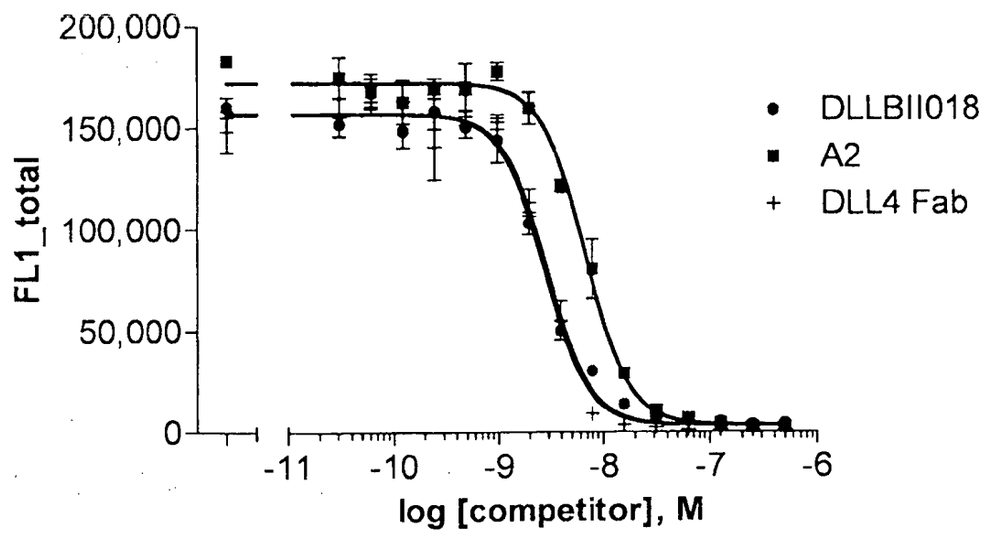


Fig. 51-2

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



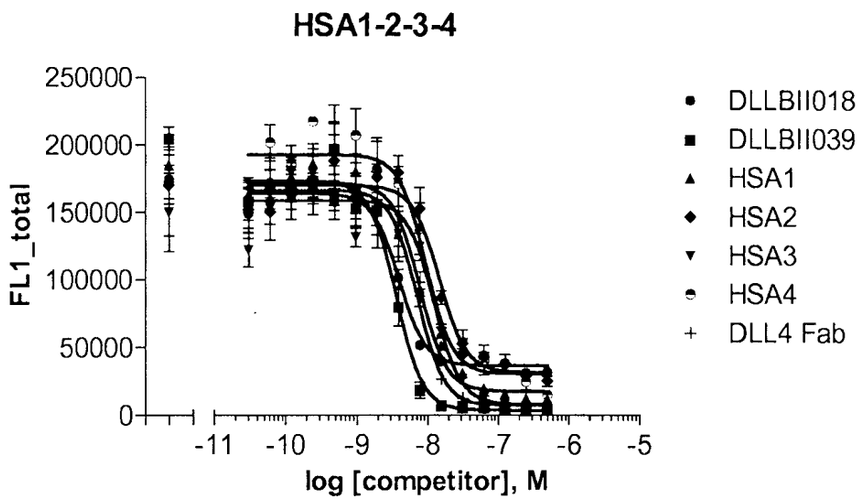
CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT



165

Fig. 51-3

CHO-hDLL4/hNotch1-Fc FMAT



CHO-mDLL4/hNotch1-Fc FMAT

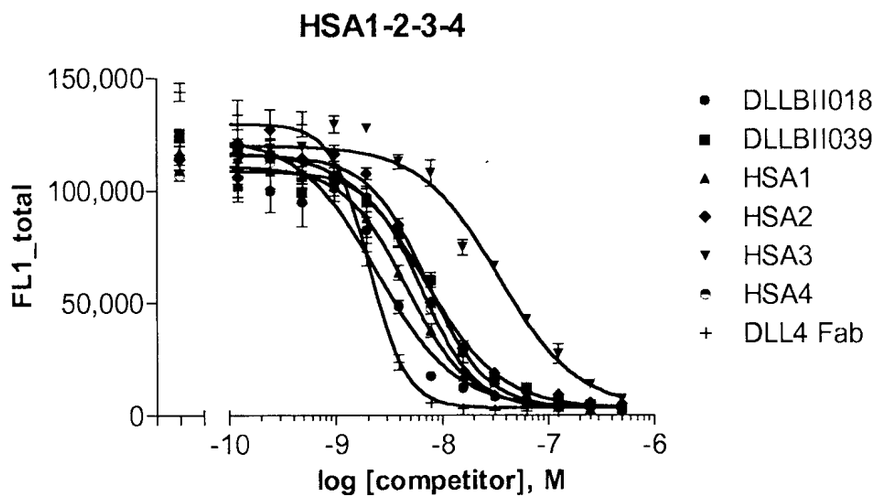
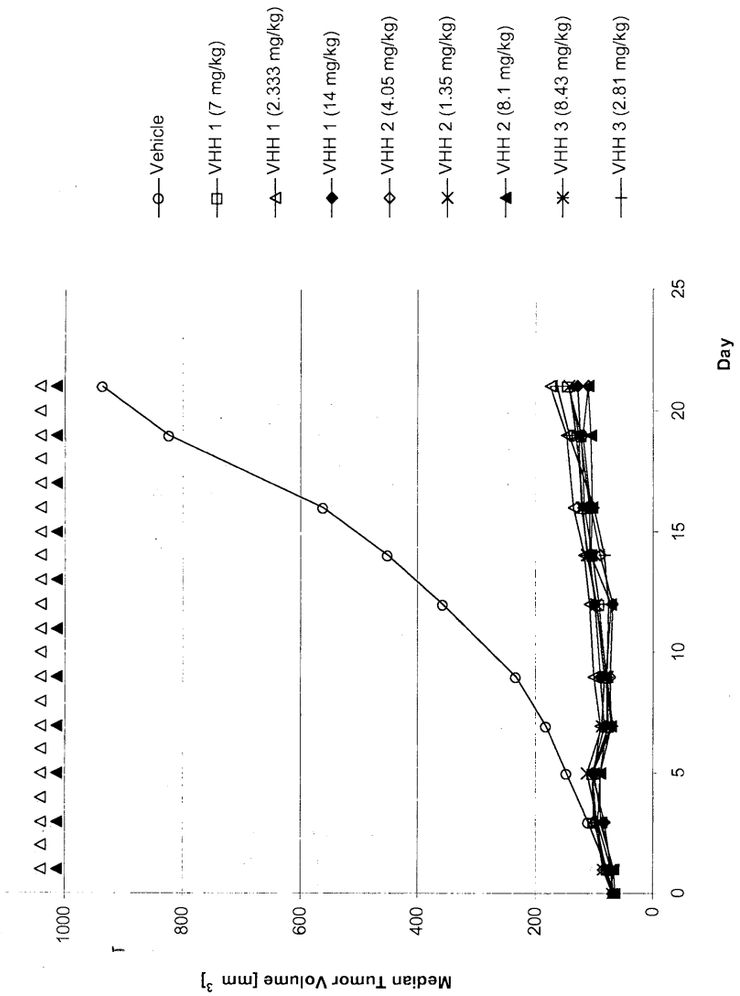


Fig. 52A

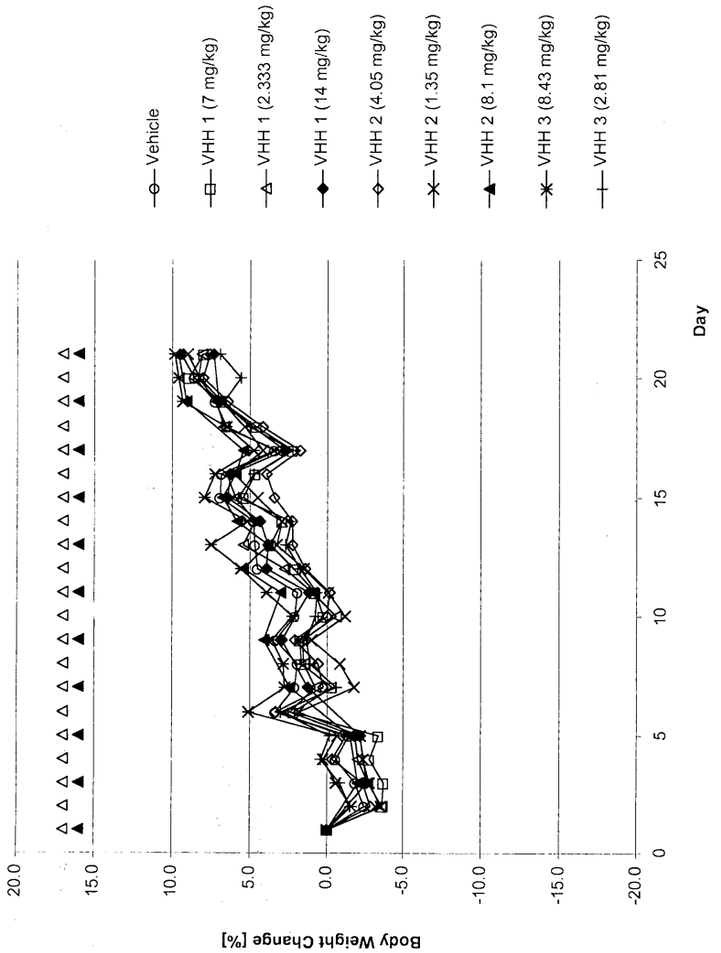


166
AGS

Tumor Volume [mm3]
2000
1500
1000
500
0
Vehicle
VHH 1 (7 mg/kg)
VHH 1 (2.333 mg/kg)
VHH 1 (14 mg/kg)
VHH 2 (4.05 mg/kg)
VHH 2 (1.35 mg/kg)
VHH 2 (8.1 mg/kg)
VHH 3 (8.43 mg/kg)
VHH 3 (2.81 mg/kg)

Fig. 52B

Fig. 52C


Vehicle
VHH 1 (7 mg/kg)
VHH 1 (2.333 mg/kg)
VHH 1 (14 mg/kg)
VHH 2 (4.05 mg/kg)
VHH 2 (1.35 mg/kg)
VHH 2 (8.1 mg/kg)
VHH 3 (8.43 mg/kg)
VHH 3 (2.81 mg/kg)
Body Weight Change [%]
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-5.0
-10.0
-15.0
-20.0
0
5
10
15
20
25
Day

167

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/064695

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/00 C07K16/22 C07K16/18
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/060705 A2 (GENENTECH INC [US]; YAN MINHONG [US]; WU YAN [US]) 22 May 2008 (2008-05-22) examples -----	1-23, 30-35
Y	WO 2008/101985 A2 (ABLYNX NV [BE]; MERCHIERS PASCAL GERARD [BE]; VERHEESEN PETER [BE]; HO) 28 August 2008 (2008-08-28) cited in the application page 6, line 16 - line 22; sequences 542,675 page 90, line 1 - page 92, line 5 page 151, line 12 - page 154, line 14; examples ----- -/--	1-23, 30-35

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 March 2011	15/03/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Loubradou, Gabriel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/064695

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/019144 A2 (REGENERON PHARMA [US]; WIEGAND STANLEY J [US]; PAPADOPOULOS NICHOLAS J) 14 February 2008 (2008-02-14) page 1, paragraph 0006; examples -----	35
A	WO 2008/076379 A2 (REGENERON PHARMA [US]; PAPADOPOULOS NICHOLAS J [US]; MARTIN JOEL H [US) 26 June 2008 (2008-06-26) * abstract; examples; tables 1,2,4 -----	1-35
A	GB 2 449 354 A (SMART TARGETING LTD [GB]) 19 November 2008 (2008-11-19) examples 3-9 -----	1-35
A	US 2009/246199 A1 (NOGUERA-TROISE IRENE [US] ET AL) 1 October 2009 (2009-10-01) examples -----	1-35
A	HARMSEN M M ET AL: "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 77, no. 1, 18 August 2007 (2007-08-18), pages 13-22, XP019560673, ISSN: 1432-0614 page 14, left-hand column, paragraph 2 - page 19, right-hand column, paragraph 1 -----	1-35
A	ROOVERS R C ET AL: "Nanobodies in therapeutic applications", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 9, no. 4, 1 January 2007 (2007-01-01) , pages 327-335, XP009093747, ISSN: 1464-8431 * abstract page 330, left-hand column, paragraph 3 - page 333, left-hand column, paragraph 1 -----	1-35
A	MUYLDERMANS S ET AL: "Camelid immunoglobulins and nanobody technology", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 128, no. 1-3, 15 March 2009 (2009-03-15), pages 178-183, XP025987509, ISSN: 0165-2427 [retrieved on 2008-10-17] page 181, right-hand column, last paragraph - page 182, left-hand column, paragraph 1 -----	1-35

-/--

16Y

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/064695

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VINCKE CÉCILE ET AL: "General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 284, no. 5, 30 January 2009 (2009-01-30), pages 3273-3284, XP009124408, ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2008-11-14] * abstract	1-35
A	AHMADVAND DAVOUD ET AL: "Production and Characterization of a High-Affinity Nanobody Against Human Endoglin", HYBRIDOMA, vol. 27, no. 5, October 2008 (2008-10), pages 353-360, XP002573146, ISSN: 1554-0014 page 357, left-hand column, paragraph 2	1-35
A	MARVIN J S ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES FOR DUAL-MODALITY CANCER THERAPY: KILLING TWO SIGNALING CASCADES WITH ONE STONE", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 9, no. 2, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 184-193, XP009067444, ISSN: 1367-6733 * abstract page 187, right-hand column, paragraph 2	1-35
A	SHEN ET AL: "Single variable domain antibody as a versatile building block for the construction of IgG-like bispecific antibodies", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 318, no. 1-2, 3 January 2007 (2007-01-03), pages 65-74, XP005820137, ISSN: 0022-1759, DOI: DOI:10.1016/J.JIM.2006.09.020 * abstract	1-35
A,P	WO 2010/040508 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; BAEHNER MONIKA [DE]; BRINKMANN ULRICH [DE]; GE) 15 April 2010 (2010-04-15) example 18	1-35

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/064695

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	WO 2009/124931 A2 (ABLYNX NV [BE]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOTT [BE]; DE HAARD JOHANNES JO) 15 October 2009 (2009-10-15) examples ----	1-23, 30-35
X,P	WO 2009/134776 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; MORGAN-LAPPE SUSAN E [US]; REILLY) 5 November 2009 (2009-11-05) page 26, line 19 - page 38, line 9; figure 1 page 143, line 9 - line 30; examples ----	1,22,23, 32-34
E	WO 2010/129304 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS INC [US]; GURNEY AUSTIN L [US]; SATO AARON KEN) 11 November 2010 (2010-11-11) page 6, paragraph 0021 page 28, paragraph 00117 - page 30, paragraph 00125 page 43, paragraph 00160 - page 44, paragraph 00162 ----	1,22,23, 32-34

169
~~169~~

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/064695

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008060705 A2	22-05-2008	AR 061246 A1	13-08-2008
		AU 2007319672 A1	22-05-2008
		CA 2654000 A1	22-05-2008
		EC SP099027 A	27-02-2009
		EP 2032604 A2	11-03-2009
		JP 2009539384 T	19-11-2009
		KR 20090027227 A	16-03-2009
		US 2008175847 A1	24-07-2008
		US 2010292312 A1	18-11-2010
WO 2008101985 A2	28-08-2008	AU 2008219216 A1	28-08-2008
		CA 2678218 A1	28-08-2008
		EP 2121757 A2	25-11-2009
		JP 2010518839 T	03-06-2010
		US 2010120681 A1	13-05-2010
WO 2008019144 A2	14-02-2008	AU 2007281916 A1	14-02-2008
		CA 2660235 A1	14-02-2008
		CN 101500605 A	05-08-2009
		CR 10627 A	14-04-2009
		EP 2054082 A2	06-05-2009
		JP 2010500355 T	07-01-2010
		KR 20090039823 A	22-04-2009
		RU 2009107921 A	20-09-2010
		SV 2009003161 A	01-02-2010
		US 2008181893 A1	31-07-2008
		ZA 200900337 A	27-01-2010
WO 2008076379 A2	26-06-2008	AU 2007334366 A1	26-06-2008
		CA 2672622 A1	26-06-2008
		CR 10863 A	23-07-2009
		EC SP099404 A	31-07-2009
		EP 2115003 A2	11-11-2009
		JP 2010512749 T	30-04-2010
		KR 20090088936 A	20-08-2009
		SV 2009003296 A	27-10-2009
		US 2008181899 A1	31-07-2008
		US 2009017035 A1	15-01-2009
		US 7534868 B1	19-05-2009
GB 2449354 A	19-11-2008	EP 2167542 A1	31-03-2010
		WO 2008139202 A1	20-11-2008
		JP 2010526551 T	05-08-2010
		US 2010303812 A1	02-12-2010
US 2009246199 A1	01-10-2009	NONE	
WO 2010040508 A1	15-04-2010	AR 073775 A1	01-12-2010
		US 2010111967 A1	06-05-2010
WO 2009124931 A2	15-10-2009	AU 2009235467 A1	15-10-2009
		CA 2720763 A1	15-10-2009
		EP 2260058 A2	15-12-2010
WO 2009134776 A2	05-11-2009	AR 071526 A1	23-06-2010
		AU 2009241589 A1	05-11-2009
		CA 2722466 A1	05-11-2009
		EP 2282769 A2	16-02-2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/064695

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PE 18452009 A1	08-01-2010
		US 2010076178 A1	25-03-2010
		UY 31792 A	14-12-2009
WO 2010129304 A2	11-11-2010	NONE	

170

MOLÉCULAS DE UNIÓN BIESPECÍFICAS PARA LA TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere al campo de terapia humana, en particular terapia contra el cáncer y agentes y composiciones útiles en dicha terapia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Como se resume en el documento US 2008/0014196, la angiogénesis está implicada en la patogénesis de varios trastornos, que incluyen tumores sólidos y metástasis.

En el caso de crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia y para proporcionar alimento para el crecimiento y metástasis del tumor (Folkman *et al.*, Nature 339 -58 (1989)), que permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento en comparación con las células normales. Por lo tanto, las terapias anti-angiogénesis se han convertido en una interesante opción de tratamiento para diversos tipos de tumores.

Uno de los factores pro-angiogénicos más importantes es el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, en adelante denominado "VEGF"), que pertenece a la familia de genes que incluye el factor del crecimiento placentario (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E y que existe en varias isoformas que surgen del corte y empalme alternativo del ARNm de un solo gen, siendo el VEGF165 la isoforma biológicamente más relevante. Por lo tanto, la mayoría de las terapias anti-cancerosas que dependen de la anti-angiogénesis se han enfocado en el bloqueo de la ruta del VEGF (Ferrara *et al.*, Nat Rev Drug Discov. Mayo 2004; 3(5):391-400).

Recientemente, se ha identificado Dll4 (o de tipo Delta 4 o ligando de tipo delta 4) como una diana prometedora para la terapia contra el cáncer. Dll4 es un miembro de la familia Delta de ligandos Notch. En algunos canceres la señalización Notch está mal regulada, por ejemplo en la leucemia linfoblástica aguda de células T y en tumores sólidos (Sharma et al. 2007, Cell Cycle 6 (8): 927–30; Shih et al., Cancer Res. 1 de marzo del 2007; 67(5): 1879-82).

El dominio extracelular de Dll4 se compone de un dominio N-terminal, un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) y un tándem de repeticiones de tipo factor de

171

crecimiento epidérmico (EGF). Generalmente, se reconoce que los dominios EGF comprenden 218-251 restos aminoacídicos (EGF-1; dominio 1), 252-282 (EGF-2; domino2), 284-322 (EGF-3; domino 3), 324-360 (EGF-4; dominio 4) y 362-400 (EGF-5; dominio5), con el dominio DSL hasta aproximadamente 173-217 restos aminoacídicos y el dominio N-terminal hasta aproximadamente 27-172 restos aminoacídicos de hDll4 (documento WO 2008/076379).

Se ha notificado que Dll4 muestra expresión muy selectiva por el endotelio vascular, en particular el endotelio arterial (Shutter *et al.* (2000) Genes Develop. 14: 1313-1318). Estudios recientes en ratones han demostrado que Dll4 está inducido por VEGF y es un regulador de retroalimentación negativo que impide el crecimiento y la ramificación vascular. Coherente con esta función, la deleción o inhibición de Dll4 da como resultado angiogénesis excesiva (Scehnet *et al.*, Blood. 1 de junio 2007; 109 (11):4753-60). Esta angiogénesis incontrolada disminuye paradójicamente el crecimiento tumoral debido a la formación de vasculatura no-productiva, incluso en tumores resistentes a terapias anti-VEGF (Thurston *et al.*, Nat Rev Cancer. Mayo de 2007; 7(5):327-31; documento WO 2007/070671; Noguera-Troise *et al.*, Nature. 21 de diciembre de 2006; 444(7122)). Además de los efectos sobre la angiogénesis tumoral, se ha demostrado que la inhibición de Dll4 reduce la frecuencia de las células madre cancerosas en modelos tumorales preclínicos (Hoey *et al.*, Cell Stem Cell. 7 de agosto de 2009; 5(2):168-77).

Se han descrito diversos compuestos biológicos que están en desarrollo (pre-) clínico que apuntan hacia Dll4: REGN-421 (= SAR153192; Regeneron, Sanofi-Aventis; documento WO2008076379) y OPM-21M18 (OncoMed) (Hoey *et al.*, Cell Stem Cell. 7 de agosto de 2009; 5(2):168-77), ambos anticuerpos de Dll4 completamente humanos; YW152F (Genentech), un anticuerpo de Dll4 humanizado (Ridgway *et al.*, Nature. 21 de diciembre de 2006; 444(7122):1083-7); Dll4-Fc (Regeneron, Sanofi-Aventis), una proteína de fusión recombinante compuesta por la región extracelular de Dll4 y la región Fc de la IgG1 humana (Noguera-Troise *et al.*, Nature. 21 de diciembre de 2006; 444(7122)).

Se ha demostrado que la inhibición combinada de VEGF y Dll4 proporciona una actividad anti-tumoral superior en comparación solo con anti-VEGF en modelos de xenoinjerto de tipos de tumores múltiples y en modelos de tumores resistentes anti-VEGF (Noguera-Troise *et al.*, Nature. 21 de diciembre de 2006; 444(7122):1032-7; Ridgway *et al.*, Nature. 21 de diciembre de 2006; 444(7122):1083-7; documento US 2008175847).

172

A la vista de su aplicación terapéutica, los anticuerpos monoclonales (MAb) y las proteínas de fusión tienen varias carencias: Para prevenir su degradación, deben almacenarse a temperaturas próximas a la congelación. Además, como se digieren rápidamente en el intestino, no son adecuadas para la administración oral. Otra limitación importante de los MAb para la terapia contra el cáncer es el escaso transporte, que da como resultado bajas concentraciones y una falta de dirección de todas las células en un tumor.

Además, el objetivo de las terapias de la técnica que están basadas en la dirección de VEGF y DII4, representa una terapia de combinación que implica dos inhibidores individuales, es decir, una molécula de unión a VEGF y una molécula de unión a DII4 distinta. Sin embargo, estas terapias tienen el inconveniente de que el desarrollo y la producción de dos fármacos distintos implica costes elevados y muchos recursos, ya que dos fármacos pueden tener diferentes propiedades farmacocinéticas y la administración de dos fármacos no es conveniente para el paciente.

A la vista de lo anterior, ha sido un objeto de la invención proporcionar moléculas mejoradas para la terapia anti-tumoral en seres humanos.

La presente invención se basa en el concepto de combinar una o más moléculas de unión a VEGF con una o más moléculas de unión a DII4 en un sólo agente terapéutico.

Por lo tanto, la invención se refiere a moléculas de unión biespecíficas que comprenden una o más moléculas de unión a DII4 y una o más moléculas de unión a VGEF.

A continuación, si no se indica otra cosa, la expresión "molécula de unión" (o "molécula de unión a antígeno") se refiere a cualquiera o ambas moléculas de unión a DII4, en particular un dominio variable sencillo de inmunoglobulina o una molécula de unión a VEGF, en particular un dominio variable sencillo de inmunoglobulina. La expresión "molécula de unión biespecífica" se refiere a una molécula que comprende al menos una molécula de unión a DII4 (o "componente de unión") y al menos una molécula de unión a VEGF (o "componente de unión"). Una molécula de unión biespecífica puede contener más de una molécula de unión a DII4 y/o más de una molécula de unión a VEGF, es decir en el caso en que la molécula de unión biespecífica contenga una molécula de unión a DII4 biparotópica (como se define más adelante) y/o una molécula de unión a VEGF biparotópica, en la parte de la molécula que se une a DII4 o a VEGF, es decir en su "componente de unión a DII4"

173
172

(o componente anti-DII4) o "componente de unión a VEGF" (o componente anti-VEGF) respectivamente.

Estas moléculas de unión biespecíficas de la invención son útiles como agentes farmacológicamente activos en composiciones en la prevención, tratamiento, alivio y/o diagnóstico de enfermedades o afecciones que pueden modularse por inhibición de DII4, tales como el cáncer.

Otro objetivo de la invención ha sido proporcionar métodos para la prevención, tratamiento, alivio y/o diagnóstico de dichas enfermedades, trastornos o afecciones, que implican el uso y/o la administración de dichos agentes y composiciones.

En particular, un objeto de la invención ha sido proporcionar dichos agentes, composiciones y/o métodos farmacológicamente activos que proporcionan determinadas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o métodos actualmente usados y/o conocidos en la técnica.

Estas ventajas incluyen propiedades terapéuticas y/o farmacológicas mejoradas y/u otras propiedades ventajosas, por ejemplo con fines de preparación, especialmente en comparación con anticuerpos convencionales como los descritos anteriormente, o fragmentos de los mismos.

Más en particular, ha sido un objeto de la invención proporcionar nuevas moléculas, y, específicamente, moléculas que se unen a mamíferos y especialmente, DII4 de ser humano y VEGF de ser humano, en el que dichas moléculas son adecuadas para los fines terapéuticos y de diagnóstico como se describe en la presente memoria.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con un primer aspecto, se proporcionan moléculas de unión biespecíficas, que comprenden un componente de unión a DII4 y un componente de unión a VEGF en una sola molécula.

Más específicamente, una molécula de unión biespecífica de la invención comprende esencialmente (i) un componente de unión a DII4 que se une específicamente al menos a un epítopo de DII4 y (ii) un componente de unión a VEGF que se une específicamente al menos a un epítopo de VEGF, en el que los componentes están unidos entre sí de manera que se unen simultáneamente a DII4 y VEGF o se unen tanto a DII4 como a VEGF a la vez.

De acuerdo con aspectos preferidos de la invención, los dos componentes comprenden uno más dominios variables sencillos de inmunoglobulina que pueden

174

ser, independientemente entre sí, VHH o anticuerpos de dominio y/o cualquier otro tipo de dominio variable sencillo de inmunoglobulina, tal como dominios VL, como se define en la presente memoria, siempre que cada uno de estos dominios variables sencillos de inmunoglobulina se unan al antígeno, es decir DII4 o VEGF, respectivamente.

De acuerdo con una realización preferida, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son del mismo tipo, en particular, todos los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son VHH o anticuerpos de dominio.

De acuerdo con una realización particularmente preferida, todos los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son VHH, preferiblemente VHH humanizados (o "secuencia optimizada", como se define en la presente memoria). Por consiguiente, la invención se refiere a moléculas de unión biespecíficas que comprenden un VHH anti-DII4 (opcionalmente humanizado o secuencia optimizada) y un VHH anti-VGEF (opcionalmente humanizado o secuencia optimizada).

Sin embargo, para el experto en la materia estará claro que lo que se describe en la presente memoria puede aplicarse análogamente a moléculas de unión biespecíficas que incluyen otros dominios variables sencillos de inmunoglobulina anti-DII4 o anti-VEGF, tales como anticuerpos de dominio.

En otro aspecto, la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican las moléculas de unión biespecíficas de la invención así a como células hospedadoras que los contienen.

La invención se refiere adicionalmente a un producto o composición que contiene o comprende al menos una molécula de unión biespecífica de la invención y opcionalmente uno o más componentes adicionales de dichas composiciones.

La invención se refiere adicionalmente a métodos para preparar o generar las moléculas de unión biespecíficas, ácidos nucleicos, células hospedadoras, productos y composiciones descritos en esta memoria.

La invención se refiere adicionalmente a aplicaciones y usos de las moléculas de unión biespecíficas, ácidos nucleicos, células hospedadoras, productos y composiciones descritos en esta memoria, así como a métodos para la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos que pueden modularse por inhibición de DII4.

Estos y otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción a continuación en este documento.

175
194

DEFINICIONES

A menos que se indique o se defina otra cosa, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que será evidente para el experto en la materia. Se hace referencia por ejemplo a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), y Roitt *et al.*, "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), así como a la técnica anterior general citada en la presente memoria; Adicionalmente, a menos que se indique otra cosa, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describan específicamente con detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera de por sí conocida, y serán evidentes para el experto en la materia. De nuevo se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, a la técnica anterior general indicada anteriormente y a las referencias adicionales citadas en ellas.

A menos que se indique otra cosa, las expresiones "*inmunoglobulina*" y "*secuencia de inmunoglobulina*" - tanto si se usan en esta memoria para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional- se usan como términos generales para incluir al anticuerpo de tamaño completo, a las cadenas individuales de estos, así como a todas las partes, dominios o fragmentos de estos (incluyendo, pero sin limitación, los dominios de unión a antígeno o fragmentos tales como dominios VHH o dominios VH/VL, respectivamente). Además, el término "secuencia" como se usa en la presente memoria (por ejemplo en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable (sencilla)", "secuencia de VHH" o "secuencia de proteína"), en general, debe entenderse que incluye tanto la secuencia de aminoácidos de interés así como secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que los codifican, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

El término "dominio" (o un polipéptido o proteína) como se usa en la presente memoria se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene la capacidad de conservar su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales individuales de las proteínas y en muchos casos pueden añadirse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin perder la función del resto de la proteína y/o del dominio.

176
175

La expresión "dominio de inmunoglobulina" como se usa en la presente memoria se refiere a una región globular de una cadena de anticuerpo (tal como, por ejemplo, una cadena de un anticuerpo de 4 cadenas convencional o un anticuerpo de cadena pesada) o a un polipéptido que esencialmente consta de dicha región globular. Los dominios de inmunoglobulina se caracterizan porque conservan la característica de plegamiento de la inmunoglobulina de las moléculas de anticuerpo, que constan de una estructura interlaminar bicapa de aproximadamente 7 cadenas beta antiparalelas dispuestas en dos láminas beta, opcionalmente estabilizadas por un enlace disulfuro conservado.

La expresión "dominio variable de inmunoglobulina" como se usa en la presente memoria significa un dominio de inmunoglobulina que esencialmente consta de cuatro "regiones flanqueantes" que en la técnica y en lo sucesivo en este documento se denominan "región flanqueante 1" o "FR1", "región flanqueante 2" o "FR2"; "región flanqueante 3" o "FR3" y "región flanqueante 4" o "FR4", respectivamente; cuyas regiones flanqueantes están interrumpidas por tres "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR", que en la técnica y en lo sucesivo en este documento se denominan "región determinante de la complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de la complementariedad 2" o "CDR2" y "región determinante de la complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Por lo tanto, la estructura o secuencia general de un dominio variable de inmunoglobulina puede identificarse de la siguiente manera: FR1 - CDR1 – FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. El dominio (o dominios) variable de inmunoglobulina es el que confiere especificidad a un anticuerpo por el antígeno al llevar el sitio de unión a antígeno.

La expresión "dominio variable sencillo de inmunoglobulina" como se usa en la presente memoria significa un dominio variable de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítopo del antígeno sin emparejarse con un dominio de inmunoglobulina variable adicional. Un ejemplo de dominios variables sencillos de inmunoglobulina en el sentido de la presente invención son los "anticuerpos de dominio", tales como los dominios variables sencillos de inmunoglobulina VH y VL (dominios VH y dominios VL). Otro ejemplo de dominios variables sencillos de inmunoglobulina son los "dominios VHH" (o simplemente los "VHH") de camélidos, como se define en lo sucesivo en la presente memoria.

A la vista de la definición anterior, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de 4 cadenas convencional (tal como una molécula de IgG, IgM, IgA, IgD

o IgE; conocida en la técnica) o de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv tal como un fragmento Fv o un fragmento scFv unido por puentes disulfuro, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivado de dicho anticuerpo de 4 cadenas convencional, normalmente no se consideraría como un dominio variable sencillo de inmunoglobulina, ya que, en estos casos, la unión al epítopo respectivo de un antígeno normalmente no se produciría por un dominio de inmunoglobulina (sencillo) sino por un par de dominios de inmunoglobulina (asociación) tales como dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par VH-VL de dominios de inmunoglobulina, que se unen conjuntamente a un epítopo del antígeno respectivo.

Los "dominios VHH", también conocidos como VHH, dominios V_HH, fragmentos de anticuerpo VHH y anticuerpos VHH, se han descrito originalmente como el dominio (variable) de inmunoglobulina de unión a antígeno de "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, de "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)). Se ha elegido la expresión "dominio de VHH" para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (denominados en la presente memoria "dominios V_H" o "dominios VH") y de los dominios variables de cadena ligeraa que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (denominados en la presente memoria "dominios V_L" o "dominios VL"). Los dominios VHH puede unirse específicamente a un epítopo sin ningún dominio de unión a antígeno adicional (a diferencia de los dominios VH o VL en un anticuerpo de 4 cadenas convencional, en cuyo caso un dominio VL junto con un dominio VH reconocen el epítopo). Los dominios VHH son pequeñas unidades de reconocimiento antigénicas eficaces y robustas formadas por un dominio sencillo de inmunoglobulina.

En el contexto de la presente invención, las expresiones dominio VHH, VHH, dominio V_HH, fragmento de anticuerpo VHH, anticuerpo VHH, así como "Nanobody®" y "dominio Nanobody®" (siendo "Nanobody" una marca registrada de la compañía Ablynx N.V.; Ghent, Bélgica) se usan indistintamente y son representativos de dominios variables sencillos de inmunoglobulina (que tienen la estructura FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y se unen específicamente a un epítopo sin requerir la presencia de un segundo dominio variable de

178
177

inmunoglobulina) y que se distinguen de los dominios VH por los denominados "restos característicos", como se define, por ejemplo, en el documento WO2009/109635, Fig. 1.

Los restos aminoacídicos de un dominio variable sencillo de inmunoglobulina, por ejemplo, un VHH, se numeran de acuerdo con la numeración general para los dominios V_H proporcionados por Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación Nº 91), como se aplica a los dominios VHH de camélidos, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 2 de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). De acuerdo con esta numeración,

- La FR1 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 1-30,
- La CDR1 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 31-35,
- La FR2 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 36-49,
- La CDR2 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 50-65,
- La FR3 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 66-94,
- La CDR3 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 95-102, y
- La FR4 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 103-113.

Sin embargo, debe observarse que - como se sabe bien en la técnica para los dominios VH y para los dominios VHH - el número total de restos aminoacídicos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de restos aminoacídicos indicados por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones de acuerdo con la numeración de Kabat no pueden ocuparse en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más restos aminoacídicos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración de acuerdo con Kabat puede o no puede corresponderse con la numeración real de los restos aminoacídicos en la secuencia real.

En la técnica también se conocen métodos alternativos para numerar los restos aminoacídicos de los dominios V_H, cuyos métodos también pueden aplicarse de una manera análoga a los dominios VHH. Sin embargo, a menos que se indique otra cosa, en la presente descripción, reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración de acuerdo con Kabat y se aplicará a los dominios VHH como se ha descrito anteriormente.

El número total de restos aminoacídicos en un dominio VHH estará habitualmente en el intervalo de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. Sin embargo debe observarse que para los propósitos descritos en la presente memoria también

179
478

pueden ser adecuadas secuencias más pequeñas y más largas.

Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina (por ejemplo, los VHH y anticuerpos de dominio), tienen varias características estructurales y propiedades funcionales propias que los hace muy ventajosos para su uso en terapia como moléculas de unión a antígeno funcionales. En particular, y sin que esto sea limitativo, los dominios VHH (que ha "diseñado" la naturaleza para unirse funcionalmente a un antígeno sin emparejarse con un dominio variable de cadena ligera) puede funcionar como unidades estructurales de unión a antígeno funcionales relativamente pequeñas, sencillas.

Debido a sus propiedades particulares, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, como se definen en la presente memoria, del tipo VHH o VH (o VL) – en solitario o como parte de un polipéptido más grande, por ejemplo una molécula biparatópica o una molécula de unión biespecífica, ofrecen varias ventajas significativas:

- sólo se requiere un dominio sencillo para unir un antígeno con alta afinidad y con alta selectividad, de manera que no es necesario tener presentes dos dominios distintos, ni asegurar que estos dos dominios estén presentes en la conformación y configuración espacial apropiada (es decir mediante el uso de enlazadores especialmente diseñados, como es el caso de los scFv);
- los dominios variables sencillos de inmunoglobulina pueden expresarse a partir de una molécula de ácido nucleico sencilla y no requieren ninguna modificación post-traduccional (como glicosilación);
- los dominios variables sencillos de inmunoglobulina pueden modificarse fácilmente por ingeniería genética en formatos multivalentes y multiespecíficos (como se describe adicionalmente en la presente memoria);
- los dominios variables sencillos de inmunoglobulina tienen alta especificidad y afinidad por su diana, baja toxicidad inherente y pueden administrarse mediante vías alternativas a la infusión o inyección;
- los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son muy estables al calor, pH, proteasas y otros agentes o estados desnaturalizantes y, por lo tanto, pueden prepararse, almacenarse o transportarse sin el uso de equipos de refrigeración;
- los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son fáciles y relativamente asequibles de preparar, tanto a pequeña escala como a una escala de fabricación. Por ejemplo, los dominios variables sencillos de

inmunoglobulina y los polipéptidos que los contienen pueden producirse usando fermentación microbiana (por ejemplo, como se describe adicionalmente más adelante) y no requieren el uso de sistemas de expresión en mamíferos, como es el caso por ejemplo de anticuerpos convencionales;

• los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son relativamente pequeños (aproximadamente 15 kDa o 10 veces más pequeños que una IgG convencional) en comparación con anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y por lo tanto presentan mayor penetración en los tejidos (incluyendo, pero sin limitación, tumores sólidos y otros tejidos densos) y pueden administrarse en mayores dosis tales como anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos;

• Los VHH tienen propiedades específicas denominadas "de unión a cavidad" (entre otras debido a su bucle CDR3 ampliado, en comparación con los dominios VH de anticuerpos de 4 cadenas) y por lo tanto también pueden acceder a dianas y epítopos no accesibles a anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos;

• Los VHH tienen la ventaja particular de que son muy solubles y muy estables y no tienen tendencia a formar agregados (como es el caso de los dominios de unión a antígeno derivados de ratón descritos por Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989)).

Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina contenidos en los componentes de las moléculas de unión biespecíficas de la invención, no están limitados con respecto a la fuente biológica específica de la que se obtienen o a un método de preparación específico. Por ejemplo, la obtención de los VHH puede incluir las siguientes etapas:

(1) aislar el dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada de origen natural; o seleccionar una biblioteca que comprenda anticuerpos de cadena pesada o los VHH y aislar los VHH de los mismos;

(2) expresar una molécula de ácido nucleico que codifica un VHH con la secuencia de origen natural;

(3) "humanizar" (u optimizar la secuencia) un VHH, opcionalmente después de maduración por afinidad, con una secuencia de origen natural o expresar un ácido nucleico que codifica dicho VHH humanizado;

181
186

(4) "camelizar" (como se describe más adelante) un dominio pesado variable sencillo de inmunoglobulina procedente de un anticuerpo de origen natural de una especie animal, en particular una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o expresar una molécula de ácido nucleico que codifica dicho dominio camelizado;

(5) "camelizar" un VH o expresar una molécula de ácido nucleico que codifica dicho VH camelizado;

(6) usar técnicas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos sintética o semi-sintéticamente;

(7) preparar una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio VHH usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos, seguido de la expresión del ácido nucleico así obtenido;

(8) someter anticuerpos de cadena pesada o VHH a maduración por afinidad, a mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis al azar o mutagénesis dirigida) y/o cualquier otra técnica (o técnicas) para aumentar la afinidad y/o especificidad del VHH; y/o

(9) combinaciones o selecciones de las etapas anteriores.

El experto en la materia conoce y tendrá claro los métodos y técnicas adecuadas para realizar las etapas descritas anteriormente.

De acuerdo con una realización específica, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina presentes en las moléculas de unión biespecíficas de la invención son los VHH con una secuencia de aminoácidos que esencialmente se corresponde con la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH de origen natural, pero que se ha humanizado (secuencia- optimizada), opcionalmente después de maduración por afinidad), es decir sustituyendo uno o más restos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia VHH de origen natural por uno o más de los restos aminoacídicos que se producen en la posición (o posiciones) correspondiente en un dominio pesado variable de un anticuerpo de 4 cadenas convencional procedente de un ser humano. Esto puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica, que un experto en la materia puede usar de manera rutinaria.

Un VHH de secuencia optimizada puede contener una o más secuencias con regiones flanqueantes completamente humanas, y, en otra realización aún más específica, puede contener secuencias humanas con regiones flanqueantes derivadas de las secuencias DP-29, DP-47, DP-51, de la línea germinal humana

182

Vh3, o partes de las mismas, o ser muy homólogas a estas. Por lo tanto, un protocolo de humanización puede comprender la sustitución de cualquiera de los restos de VHH por los restos flanqueantes correspondientes 1, 2 y 3 (FR1, FR2 y FR3) de genes de VH de la línea germinal tales como DP 47, DP 29 y DP 51) en solitario o en combinación. Las regiones flanqueantes (FR) adecuadas de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina de la invención pueden seleccionarse de estas como se indica, por ejemplo, en el documento WO 2006/004678 y específicamente, incluir las clases denominadas "KERE" y "GLEW". Particularmente se prefieren los dominios variables sencillos de inmunoglobulina que tienen la secuencia de aminoácidos G-L-E-W aproximadamente en las posiciones 44 a 47 y sus homólogos respectivos humanizados.

Como ejemplo, una sustitución humanizante para los VHH que pertenecen al grupo 103 P, R, S y/o al grupo GLEW (como se define más adelante) es 108Q por 108L. En la técnica se conocen métodos para humanizar dominios variables sencillos de inmunoglobulina.

A la vista de una aplicación terapéutica, la unión de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina con propiedades mejoradas, por ejemplo afinidad aumentada o inmunogenicidad disminuida, puede obtenerse a partir de moléculas de unión individuales por técnicas conocidas en la técnica, tales como maduración por afinidad (por ejemplo, comenzando a partir de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o de origen natural), injertando CDR, humanizando, combinando fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR usando cebadores solapantes y técnicas similares modificando genéticamente secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por el experto en la materia; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las anteriores, también denominada "optimización de secuencia", como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, se hace referencia, a los manuales convencionales, así como a la descripción y ejemplos adicionales.

Si es apropiado, puede obtenerse una molécula de unión con afinidad aumentada por maduración de la afinidad de otra molécula de unión, representando la última, con respecto a la molécula madurada por afinidad, la molécula de unión "parental".

Anteriormente se han descrito métodos para obtener los VHH que se unen a un antígeno o epítopo específico, por ejemplo, en los documentos WO2006/040153 y WO2006/122786. Como también se describen en ellos con detalle, dominios VHH

1 R3
+BC

derivados de camélidos que pueden "humanizarse" (denominado también en esta memoria "secuencia optimizada", "secuencia de optimización" que, además de la humanización, puede incluir una modificación adicional de la secuencia por una o más mutaciones que otorgan al VHH de propiedades mejoradas, tales como la eliminación de posibles sitios de modificación post-traduccional) sustituyendo uno o más restos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de la secuencia original de VHH por uno o más de los restos aminoacídicos que se producen en la posición (o posiciones) correspondiente en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano. Un dominio VHH humanizado puede contener una o más secuencias humanas con regiones flanqueantes y en una realización incluso más específica, puede contener secuencias humanas con regiones flanqueantes derivadas de DP-29, DP-47, DP-51 o partes de las mismas, opcionalmente combinadas con secuencias JH, tales como JH5.

Los *anticuerpos de dominio*, conocidos también como "Dab" y dAb" (usándose las expresiones "anticuerpos de dominio" y "dAb" como marcas comerciales por el grupo de compañías GlaxoSmithKline) se han descrito por ejemplo en Ward, E.S. *et al.*: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli"; Nature 341: 544-546 (1989); Holt, L.J. *et al.*: "Domain antibodies: proteins for therapy"; TRENDS in Biotechnology 21(11): 484-490 (2003); y el documento WO2003/002609.

Los anticuerpos de dominio esencialmente se corresponden con los dominios VH o VL de anticuerpos de mamíferos no camélidos, en particular anticuerpos humanos de 4 cadenas. Para unirse a un epítopo como un dominio de unión a antígeno sencillo, es decir sin emparejarse con un dominio VL o VH, respectivamente, se requiere la selección específica para dichas propiedades de unión antigénicas, por ejemplo usando bibliotecas de secuencias humanas sencillas de dominio VH o VL.

Los anticuerpos de dominio tienen, al igual que los VHH, un peso molecular de aproximadamente 13 a aproximadamente 16 kDa y, si derivan de secuencias completamente humanas, no requieren humanización, por ejemplo, para su uso terapéutico en seres humanos. Como en el caso de los dominios VHH, también se expresan bien en sistemas de expresión procariota, lo que proporciona una reducción significativa en el coste de fabricación global.

Adicionalmente, un experto en la materia también tendrá claro que es posible "injertar" una o más de las CDR mencionadas anteriormente sobre otros

"armazones", incluyendo pero sin limitación, armazones humanos o armazones que no son de inmunoglobulina. En la técnica se conocen armazones y técnicas que son adecuados para realizar dicho injerto de las CDR.

Las expresiones "epítopo" y "determinante antigénico", las cuales pueden usarse indistintamente, se refieren a la parte de una macromolécula, tal como un polipéptido, que reconocen las moléculas de unión a antígeno, tales como anticuerpos convencionales o los polipéptidos de la invención y más particularmente los sitios de unión a antígeno de dichas moléculas. Los epítopos definen el sitio de unión mínimo para una inmunoglobulina y por lo tanto representan la diana de la especificidad de una inmunoglobulina.

Un polipéptido (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la invención o generalmente una molécula de unión o un fragmento de los mismos) que puede "unirse a" o "unirse específicamente a", que "tiene afinidad por" y/o que "es específico de" un determinado epítopo, antígeno o proteína (o de al menos una parte, fragmento o epítopo de los mismos) se dice que está "contra" o "dirigido contra" dicho epítopo, antígeno o proteína o es una molécula "de unión" con respecto a dicho epítopo, antígeno o proteína. En este contexto, una molécula de unión a VEGF o Dll4 también puede denominarse "neutralizante de VEGF" o "neutralizante de Dll4", respectivamente.

Generalmente, el término "especificidad" se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o epítopos a los cuales puede unirse una molécula de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno particular (tal como un dominio variable sencillo de inmunoglobulina). La especificidad de una molécula de unión por el antígeno puede determinarse basándose en su afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (KD), es una medida para la intensidad de unión entre un epítopo y un sitio de unión al antígeno en la proteína de unión al antígeno: a menor valor de KD, mayor intensidad de unión entre un epítopo y la molécula de unión al antígeno (como alternativa, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (KA) que es 1/KD). Como quedará claro para el experto (por ejemplo, basándose en descripción adicional en la presente memoria), la afinidad puede determinarse de una manera de por sí conocida, dependiendo del antígeno de interés específico. La avidez mide la intensidad de unión entre una molécula de unión al antígeno (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio

155
184

variable sencillo de inmunoglobulina o un polipéptido que lo contiene) y el antígeno pertinente. La avidez está relacionada con la afinidad entre un epítopo y su sitio de unión al antígeno en la molécula de unión al antígeno y el número de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión al antígeno.

Se denomina *paratopo* a la parte de una molécula de unión al antígeno que reconoce al epítopo.

A menos que se indique otra cosa, la expresión "molécula de unión a Dll4" o "molécula de unión VEGF" incluye anticuerpos anti-Dll4 o anti-VEGF, fragmentos de anticuerpos anti-Dll4 o anti-VEGF, "moléculas de tipo anticuerpo anti-Dll4" o "moléculas de tipo anticuerpo anti-VEGF", como se define en la presente memoria y conjugados con cualquiera de estos. Los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales y monoclonales quimerizados. El término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas completas, como anticuerpos monoclonales producidos por expresión recombinante en células hospedadoras, así como fragmentos de anticuerpos o "moléculas de tipo anticuerpo", incluyendo anticuerpos monocatenarios y anticuerpos lineales, denominados también "SMIP" ("pequeños productos inmunofarmacéuticos modulares"), como se describe, por ejemplo, en el documento WO 02/056910; las moléculas de tipo anticuerpo incluyen dominios variables sencillos de inmunoglobulina, como se define en la presente memoria. Otros ejemplos de moléculas de tipo anticuerpo son los anticuerpos de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) o moléculas con CDR injertadas.

Una *"molécula de unión a VEGF"* o *"molécula de unión a Dll4"* respectivamente, se refiere tanto a moléculas de unión diana monovalentes (es decir, moléculas que se unen a un epítopo de la diana respectiva) así como a moléculas de unión bi- o multivalentes (es decir, moléculas de unión que se unen a más de un epítopo, por ejemplo moléculas "biparatópicas" como se define a continuación en la presente memoria). Las moléculas de unión a VEGF (o a Dll4) que contienen más de un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF (o a Dll4) se denominan también moléculas de unión "formateadas", éstas pueden comprender, dentro del componente de unión a la diana, además de los dominios variables sencillos de inmunoglobulina, enlazadores y/o restos con funciones efectoras, por ejemplo, restos que amplían la semivida como dominios variables sencillos de inmunoglobulina de unión a albúmina y/o un compañero de fusión como albúmina de suero y/o un polímero unido como PEG.

La expresión "molécula de unión a VEGF (o Dll4)" biparatópica o "dominio

186
185

variable sencillo de inmunoglobulina biparatópico" como se usa en la presente memoria, significará una molécula de unión que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina y un segundo dominio variable sencillo de inmunoglobulina como se define en la presente memoria, en la que las dos moléculas se unen a dos epítopos no solapantes del antígeno respectivo. Las moléculas de unión biparatópicas se componen de dominios variables sencillos de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades con respecto al epítopo. Se denomina *paratopo* a la parte de una molécula de unión al antígeno (tal como un anticuerpo o un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la invención) que reconoce al epítopo.

Aunque se prefiere menos, una molécula de unión formateada también puede comprender dos dominios variables sencillos de inmunoglobulina idénticos o dos dominios variables sencillos de inmunoglobulina diferentes que reconocen al mismo epítopo o a epítopos solapantes o a su antígeno respectivo. En este caso, con respecto al VEGF, los dos dominios variables sencillos de inmunoglobulina pueden unirse al mismo epítopo o a un epítopo solapante en cada uno de los dos monómeros que forman el dímero del VEGF.

Típicamente, las moléculas de unión de la invención se unirán con una constante de disociación (K_D) de 10E-5 a 10E-14 moles/litro (M) o inferior y preferiblemente de 10E-7 a 10E-14 moles/litro (M) o inferior, más preferiblemente de 10E-8 a 10E-14 moles/litro, e incluso más preferiblemente de 10E-11 a 10E-13, medido, por ejemplo, en un ensayo Biacore o Kinexa) y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos 10E7 ME-1, preferiblemente al menos 10E8 ME-1, más preferiblemente al menos 10E9 ME-1, tal como al menos 10E11 ME-1. Generalmente se considera que cualquier valor K_D superior a 10E-4 M indica unión no específica. Preferiblemente, un polipéptido de la invención se unirá al antígeno deseado, es decir a VEGF o a Dll4, respectivamente, con una K_D inferior a 500 nM, preferiblemente inferior a 200 nM, más preferiblemente inferior a 10 nM, tal como inferior a 500 pM. La unión específica de una proteína de unión al antígeno con un antígeno o epítopo puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida de por sí, que incluye, por ejemplo, los ensayos descritos en la presente memoria, el análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competencia de tipo sándwich y las diferentes variantes de los mismos de por si conocidas en la técnica.

182
186

Los restos aminoacídicos se indicarán de acuerdo con el código convencional de aminoácidos de tres letras o una letra, generalmente conocido y acordado en la técnica. Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, la expresión "diferencia de aminoácido" se refiere a inserciones, deleciones o sustituciones del número de restos aminoacídicos indicado en una posición de la secuencia de referencia, en comparación con una segunda secuencia. En el caso de sustitución (o sustituciones), dicha sustitución (o sustituciones) será preferiblemente una sustitución (o sustituciones) de aminoácidos conservativa, que significa que un resto aminoacídico se sustituye por otro resto aminoacídico de estructura química similar y que tiene escasa o esencialmente ninguna influencia en la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Dichas sustituciones conservativas de aminoácidos se conocen bien en la técnica, por ejemplo a del documento WO 98/49185, en el que las sustituciones conservativas de aminoácidos son preferiblemente sustituciones en las que, dentro de los siguientes grupos (i) - (v), se sustituye un aminoácido por otro resto aminoacídico dentro del mismo grupo: (i) restos pequeños, alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (ii) restos polares, cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln, (iii) restos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (iv) restos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cis; y (v) restos aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Las sustituciones conservativas de aminoácidos particularmente preferidas son las siguientes: Ala por Gly o Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o His; Asp por Glu; Cis por Ser; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Ala o Pro; His por Asn o Gln; Ile por Leu o Val; Leu por Ile o Val; Lys por Arg, Gln o Glu; Met por Leu, Tyr o Ile; Phe por Met, Leu o Tyr; Ser por Thr, Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp o Phe; Val por Ile o Leu.

Se considera que un polipéptido o una molécula de ácido nucleico está "(en forma) esencialmente aislado" - por ejemplo, cuando se compara con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo a partir del cual se ha obtenido - cuando se ha separado de al menos otro componente con el cual está habitualmente asociado en dicha fuente o medio, tal como otra proteína/polipéptido, otro ácido nucleico, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente secundario. En particular, se considera que un polipéptido o molécula de ácido nucleico está "esencialmente aislado" cuando se ha purificado al menos dos veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces y hasta 1.000 veces o más. Un polipéptido o

187
188

molécula de ácido nucleico que está "en forma esencialmente aislado" es preferible esencialmente homogéneo, como se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida.

La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de moléculas de unión a VEGF indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. Esto puede calcularse o determinarse como se describe en el párrafo f) en las páginas 49 y 50 del documento WO 08/020079. La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservativas.

En la técnica se conocen métodos alternativos para numerar los restos aminoacídicos de los dominios V_H, cuyos métodos también pueden aplicarse de manera análoga a los dominios VHH. Sin embargo, en la presente descripción, reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración de acuerdo con Kabat y se aplicará a los dominios VHH como se describe anteriormente, a menos que se indique otra cosa.

Una molécula de unión " madurada por afinidad", en particular un VHH o un anticuerpo de dominio, tiene una o más modificaciones en una o más CDR que dan como resultado una afinidad mejorada para su diana, en comparación con la molécula de unión parental respectiva. Las moléculas de unión maduradas por afinidad pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como describen Marks *et al.*, 1992, Biotechnology 10:779-783, o Barbas, *et al.*, 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813.; Shier *et al.*, 1995, Gene 169:147-155; Yelton *et al.*, 1995, Immunol. 155: 1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; y Hawkins *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 226(3): 889 896; KS Johnson y RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

Para la presente invención, una "secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: x": incluye, si no se indica otra cosa, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº: x respectiva;

a) secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº: x respectiva;

b) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de

aminoácidos con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº: x respectiva.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza típicamente por una proliferación/crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer a tratar con una molécula de unión biespecífica de la invención, incluyen pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres, como se sugiere para el tratamiento con antagonistas de Dll4 en el documento US 2008/0014196, incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. La mala regulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que pueden tratar las composiciones y los métodos de la invención. Estos trastornos incluyen estados neoplásicos y no neoplásicos. Las neoplasias incluyen, pero sin limitación, las descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen, pero sin limitación, como se sugiere para el tratamiento con antagonistas de Dll4 en el documento US 2008/0014196, hipertrofia aberrante o no deseada, artritis, artritis reumatoide (RA), psoriasis, placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroescleróticas, retinopatías diabéticas y otras proliferativas que incluyen retinopatía de la prematuridad, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización por injerto corneal, rechazo de injerto corneal, neovascularización retinal/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (que incluyen la enfermedad de Grave), transplante corneal y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/ARDS, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado con ictus agudo/lesión cerebral

189
190

cerrada/traumatismo), inflamación sinovial, formación de catarata en RA, miositis osificante, formación de hueso hipertrófico, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad del ovario policístico, endometriosis, enfermedades del 3er espacio de fluido (pancreatitis, síndrome del compartimento, quemaduras, enfermedad intestinal), fibromas uterinos, parto prematuro, inflamación crónica tal como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto de riñón, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome nefrótico, crecimiento de masa tisular no deseada o aberrante (no cancerosa), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del pelo, síndrome de Osier-Weber, granuloma piógeno, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (tal como el asociado con pericarditis) y derrame pleural.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de unión biespecífica que comprende un componente de unión a Dll4 y un componente de unión a VEGF.

De acuerdo con realizaciones preferidas, dicho componente de unión a Dll4 y dicho componente de unión a VEGF comprende al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a Dll4 y al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF, respectivamente.

En un aspecto preferido, dicho componente de unión a Dll4 y dicho componente de unión a VEGF comprende cada uno al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF y al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a Dll4 respectivamente, en el que cada uno de dichos dominios variables sencillos de inmunoglobulina tienen cuatro regiones flanqueantes y tres regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en el que

a) una CDR3 de dicho al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a Dll4 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de

i) Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Xaa Pro Tyr Xaa Tyr Asp Xaa como se muestra en la SEC ID Nº: 1, en la que

Xaa en la posición 8 es Arg, Ala o Glu;

Xaa en la posición 11 es Leu o Glu; y

Xaa en la posición 14 es Tyr o His; y

ii) Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Gly Tyr Trp Gly Ala Tyr Xaa Asp

Tyr como se muestra en la SEC ID Nº: 2, en la que

Xaa es Gln, Ala o Tyr, y en el que

b) una de CDR3 de dicho al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF tiene la secuencia de aminoácidos Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Xaa Tyr, como se muestra en la SEC ID Nº: 3, en la que Xaa es Asp o Glu,

en el que dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF es capaz de bloquear la interacción de VEGF165 recombinante humano con VEGFR-2 recombinante humano con una velocidad de inhibición ≥ 60%.

De acuerdo con realizaciones preferidas, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son VHH.

En realizaciones preferidas, una molécula de unión biespecífica de la invención contiene dominios variables sencillos de inmunoglobulina, en particular los VHH, que se han obtenido por optimización de secuencia, opcionalmente después de maduración de la afinidad de un dominio variable sencillo de inmunoglobulina parental.

Como ejemplo, las moléculas de unión a Dll4 contenidas en las moléculas de unión biespecíficas se han obtenido de moléculas de unión a Dll4 parentales que son los VHH con las secuencias de aminoácidos mostradas en la Tabla 5 y en las SEC ID Nºs: 4-20.

Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina preferidos contenidos en el componente de unión a Dll4 derivan de un VHH con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 10.

En determinadas realizaciones, dichos dominios variables sencillos de inmunoglobulina de unión a Dll4 se han obtenido por optimización de secuencia de los VHH madurados por afinidad derivados del VHH con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 10, en la que dichos VHH madurados por afinidad tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID Nºs: 21-27 y en la Tabla 16.

En una realización preferida, dicho VHH madurado por afinidad tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en la SEC ID Nº: 22.

En determinadas realizaciones, el VHH se ha obtenido por optimización de secuencia de un VHH con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 22. Los VHH preferidos con secuencia optimizada tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de las secuencias mostradas en las SEC ID Nºs: 34 y

35 y en la Tabla 23.

Otro grupo de dominios variables sencillos de inmunoglobulina preferidos contenidos en el componente de unión a Dll4 deriva de un VHH con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 12.

En determinadas realizaciones, dichos dominios variables sencillos de inmunoglobulina de unión a Dll4 preferidos se han obtenido por optimización de secuencia de los VHH madurados por afinidad derivados del VHH con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 12, en el que dichos VHH madurados por afinidad tienen secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID Nºs: 28-33 y en la Tabla 17.

En una realización preferida, dicho VHH madurado por afinidad tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las SEC ID Nºs: 30, 32 y 33.

En una realización incluso más preferida, el VHH se ha obtenido por optimización de secuencia de un VHH con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 32. Son ejemplos de VHH de secuencia optimizada aquellos con las secuencias mostradas en las SEC ID Nºs: 36-39 y en la Tabla 24 y son particularmente preferidos, aquellos con las SEC ID Nºs: 40 y 41, mostrados en la Tabla 25.

Son ejemplos de dominios variables sencillos de inmunoglobulina de unión a VEGF capaces de bloquear la interacción de VEGF165 recombinante humano con VEGFR-2 recombinante humano, con una velocidad de inhibición ≥ 60%, los VHH mostrados en las SEC ID Nºs: 42-44 y en la Tabla 32.

Preferiblemente, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF contenido en el componente de unión a VEGF se ha obtenido por optimización de secuencia de un VHH con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 43. Los VHH preferidos tienen secuencias como se muestra en las SEC ID Nºs: 54-62, particularmente los VHH bloqueantes de receptores preferidos tienen las secuencias mostradas en las SEC ID Nºs: 63 y 64 y en la Tabla 59.

En una realización adicional, la invención se refiere a moléculas de unión biespecíficas, en las que el componente de unión a Dll4 y/o el componente de unión a VEGF comprende (o comprenden) dos o más moléculas de unión en forma de dominios variables sencillos de inmunoglobulina que se unen al antígeno Dll4 o VEGF, respectivamente, en epítopos diferentes no solapantes en el antígeno respectivo. Dichas moléculas de unión contenidas en las moléculas de unión biespecíficas de la invención comprenden dominios variables sencillos de

inmunoglobulina que se dirigen contra al menos dos epítopos no solapantes presentes en Dll4 o VEGF, respectivamente, en el que dichos dominios variables sencillos de inmunoglobulina individuales están unidos entre sí de tal manera que son capaces de unirse simultáneamente a su epítopo respectivo.

Por lo tanto, el componente anti-Dll4 y/o el anti-VEGF contenido en las moléculas de unión biespecíficas de la invención puede incluir dos (o más) dominios variables sencillos de inmunoglobulina anti-Dll4 (o anti-VEGF, respectivamente) en el que los dominios variables sencillos de inmunoglobulina se dirigen contra epítopos diferentes dentro de la diana Dll4 (o VEGF). Por lo tanto, los dos dominios variables sencillos de inmunoglobulina en una molécula de unión biespecífica tendrán diferente especificidad antigénica y por lo tanto diferentes secuencias CDR.

Dichas moléculas de unión bivalentes se denominan también "construcciones biparatópicas de anticuerpos de dominio sencillo" (si los dominios variables sencillos de inmunoglobulina constan o esencialmente constan de anticuerpos de dominio sencillo) o "construcciones biparatópicas de VHH" (si los dominios variables sencillos de inmunoglobulina constan o esencialmente constan de VHH), respectivamente, de modo que los dos dominios variables sencillos de inmunoglobulina incluirán dos paratopos diferentes.

En la molécula de unión biespecífica de la invención, una o las dos moléculas de unión pueden ser bivalentes; por ejemplo, el componente de unión a VEGF puede ser biparatópico y el componente de unión a Dll4 puede ser un dominio variable sencillo de inmunoglobulina, o el componente de unión a VEGF puede ser un dominio variable sencillo de inmunoglobulina y el componente de unión a Dll4 puede ser biparatópico.

En las moléculas de unión biespecíficas de la invención, es preferible que el componente de unión a VEGF contenga un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF, por ejemplo un VHH biparatópico.

Dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF pueden ser dos o más VHH de unión a VEGF, que son

a. VHH idénticos que son capaces de bloquear la interacción entre el VEGF humano recombinante y el VEGFR-2 humano recombinante con una velocidad de inhibición ≥ 60% o

b. VHH diferentes que se unen a epítopos no solapantes de VEGF, en el que al menos un VHH es capaz de bloquear la interacción entre el VEGF

humano recombinante y el VEGFR-2 humano recombinante con una velocidad de inhibición ≥ 60% y en el que al menos un VHH es capaz bloquear dicha interacción con una velocidad de inhibición ≤ 60%.

En las SEC ID N^{os}: 45-47 y en la Tabla 33, se indican ejemplos de los VHH capaces de bloquear dicha interacción con una velocidad de inhibición ≤ 60% (VHH "bloqueantes de no-receptores"); un VHH de este tipo preferido tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N^{o}: 45. Los VHH adecuados de este tipo, como componentes en moléculas de unión biespecíficas para terapia en seres humanos, son variantes de VHH de secuencia optimizada con una secuencia mostrada en la SEC ID N^{o}: 45, en particular, los VHH con secuencias mostradas en las SEC ID N^{os}: 65 y 66 y en la Tabla 61, un compañero de unión particularmente preferido es un VHH de unión a VEGF bivalente que tiene una secuencia mostrada en la SEC ID N^{o}: 67 (Tabla 63).

Las construcciones de VHH anti-VEGF bivalentes se ejemplifican en las SEC ID N^{os}: 48-53 y en la Tabla 45; las moléculas de unión biespecíficas para terapia en seres humanos contendrán las variantes respectivas de estos VHH de secuencia optimizada. Las moléculas de unión biespecíficas se ejemplifican en las SEC ID N^{os}: 68-73 (véase también la Tabla 66 y la Figura 39) y en las SEC ID N^{os}: 74-80 (véase también la Tabla 68 y la Figura 40); los ejemplos mostrados contienen los VHH parentales y madurados por afinidad como bloques de construcción; las moléculas de unión biespecíficas para terapia en seres humanos contendrán las variantes respectivas de estos VHH de secuencia optimizada (como se ejemplifica en las SEC ID N^{os}: 81-89 y en la Figura 48).

Las moléculas de unión biespecíficas preferidas de la invención comprenden

a) como el componente de unión a Dll4 un VHH con una secuencia seleccionada de las secuencias en la SEC ID N^{o}: 35 o 41, y

b) como componente de unión a VEGF

i) un VHH con una secuencia mostrada en la SEC ID N^{o}: 64 o

ii) un VHH biparatópico que comprende un VHH con una secuencia mostrada en la SEC ID N^{o}: 64 y un VHH con una secuencia mostrada en la SEC ID N^{o}: 67.

De acuerdo con realizaciones preferidas, el componente de unión a VEGF se localiza en el extremo N.

En las moléculas de unión biespecíficas de la invención que comienzan con EVQ, la E del N-terminal de un VHH puede sustituirse por una D (que a menudo es

un resultado de optimización de secuencia) o puede perderse (como por expresión en *E. coli*). Habitualmente esto sólo se aplica en el VHH que está situado en el extremo N. En la Figura 48 para los compuestos A1, A2 y A3 (SEC ID N^{os}: 81-83).se proporcionan ejemplos de moléculas de unión biespecíficas en las que la E del N-terminal se pierde.

De acuerdo con realizaciones preferidas, las moléculas de unión presentes en las moléculas de unión biespecíficas (las moléculas de unión a DII4 dentro del componente de unión a DII4 o las moléculas de unión a VEGF dentro del componente de unión a VEGF o los dos componentes de unión a DII4 y VEGF adyacentes) pueden estar conectados entre sí directamente (es decir, sin usar un enlazador) o mediante un enlazador. El enlazador es preferiblemente un péptido enlazador y se seleccionará para permitir la unión de las dos moléculas de unión diferentes a cada uno de los epítopos no solapantes de las dianas, ya sea dentro de una molécula diana y la misma molécula diana o dentro de dos moléculas diferentes.

En el caso de moléculas de unión biparatópicas, la selección de los enlazadores dentro del componente de unión a DIII4 o VEGF dependerá, entre otros, de los epítopos y, específicamente, de la distancia entre los epítopos en la diana al cual se unen los dominios variables sencillos de inmunoglobulina y será evidente para el experto basándose en la descripción de la presente memoria, opcionalmente después de cierto grado de experimentación rutinaria limitado.

Dos moléculas de unión (dos VHH o anticuerpos de dominio o un VHH y un anticuerpo de dominio), o dos componentes de unión, pueden unirse entre sí mediante un VHH o un anticuerpo de dominio adicional, respectivamente (en dichas moléculas de unión, los dos o más dominios variables sencillos de inmunoglobulina pueden unirse directamente a dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina adicional o mediante enlazadores adecuados). Dicho VHH o anticuerpo de dominio adicional puede ser, por ejemplo, un VHH o un anticuerpo de dominio que proporcione una semivida aumentada. Por ejemplo, el último VHH o anticuerpo de dominio puede ser uno que sea capaz de unirse a una proteína de suero (humana) tal como albúmina de suero (humana) o transferrina (humana).

De manera alternativa, los dos o más dominios variables sencillos de inmunoglobulina que se unen a la respectiva diana pueden unirse en serie (ya sea directamente o mediante un enlazador adecuado) y el VHH o el anticuerpo de dominio adicional (que puede proporcionar una semivida aumentada) pueden estar

conectados directamente o mediante un enlazador a uno de estas dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas anteriormente.

En la presente memoria, los enlazadores adecuados se describen en relación con polipéptidos específicos de la invención y pueden -por ejemplo y sin limitación– comprender una secuencia de aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos preferiblemente tiene una longitud de 9 o más aminoácidos, más preferiblemente al menos 17 aminoácidos, tal como aproximadamente de 20 a 40 aminoácidos. Sin embargo, el límite superior no es crítico pero se selecciona por razones prácticas con respecto a, por ejemplo, la producción biofarmacéutica de dichos polipéptidos.

La secuencia de enlazador puede ser una secuencia de origen natural o una secuencia de origen no natural. Si se usa para fines terapéuticos, el enlazador es preferiblemente no inmunogénico en el sujeto al cual se administra la molécula de unión biespecífica de la invención.

Un grupo útil de secuencias de enlazadores son enlazadores derivados de la región bisagra de anticuerpos de cadena pesada como se describe en el documento WO 96/34103 y WO 94/04678.

Otros ejemplos son secuencias enlazadoras de poli-alanina tales como Ala-Ala-Ala.

Otros ejemplos preferidos de secuencias enlazadoras son enlazadores Gly/Ser de diferente longitud tales como enlazadores $(gly_xser_y)_z$, que incluyen $(gly_4ser)_3$, $(gly_4ser)_4$, (gly_4ser), (gly_3ser), gly_3 y $(gly_3ser_2)_3$.

Algunos ejemplos no limitantes de enlazadores se muestran en las Figuras 40 y 48, por ejemplo, los enlazadores

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (35GS; SEC ID Nº: 90);

GGGGSGGGS (9GS; SEC ID Nº: 91);

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (40GS; SEC ID Nº: 92).

Si una molécula de unión biespecífica se modifica por la unión de un polímero, por ejemplo de un resto PEG de polietilenglicol (polietilenglicol), la secuencia enlazadora incluye preferiblemente un resto aminoacídico, tal como una cisteína o una lisina, que permita dicha modificación, por ejemplo, PEGilación en la región enlazadora.

Son ejemplos de enlazadores útiles para PEGilación:

GGGGCGGGS ("GS9, C5", SEC ID Nº: 93);

GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS25, C5, SEC ID Nº:94)
GGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGG ("GS27, C14", SEC ID Nº: 95),
GGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS35, C15", SEC ID Nº: 96), y
GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS35, C5", SEC ID Nº: 97).

Adicionalmente, el enlazador también puede ser un resto poli(etilenglicol), como se muestra, por ejemplo, en el documento WO 04/081026.

En otra realización, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina están unidos entre sí mediante otro resto (opcionalmente mediante uno o dos enlazadores), tal como otro polipéptido que, en una realización preferida pero no limitante, puede ser otro dominio variable sencillo de inmunoglobulina como se ha descrito anteriormente. Dicho resto puede ser esencialmente inactivo o puede tener un efecto biológico tal como de mejora de las propiedades deseadas del polipéptido o puede conferir una o más propiedades deseadas adicionales al polipéptido. Por ejemplo, y sin limitación, el resto puede mejorar la semivida de la proteína o del polipéptido y/o puede reducir su inmunogenicidad o mejorar cualquier otra propiedad deseada.

De acuerdo con una realización preferida, una molécula de unión biespecífica de la invención incluye, especialmente cuando se destina para su uso o se usa como un agente terapéutico, un resto que amplia la semivida del polipéptido de la invención en suero u en otros fluidos corporales de un paciente. El término "semivida" como se define es el tiempo necesario para que la concentración en suero del polipéptido (modificado) se reduzca un 50%, *in vivo*, debido, por ejemplo, a la degradación del polipéptido y/o a la eliminación y/o secuestro por mecanismos naturales.

Más específicamente, dicho resto de ampliación de la semivida puede unirse covalentemente o fusionarse a un dominio variable sencillo de inmunoglobulina y puede ser, sin limitación, una parte Fc, un resto de albúmina, un fragmento de un resto de albúmina, un resto de unión a albúmina, tal como un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-albúmina, un resto de unión a transferrina, tal como un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-transferrina, una molécula de polioxialquileno, tal como una molécula de polietilenglicol, un péptido de unión a albúmina o un derivado de hidroxietil almidón (HES).

En otra realización, la molécula de unión biespecífica de la invención

comprende un resto que se une a un antígeno encontrado en sangre, tal como albúmina de suero, inmunoglobulinas séricas, proteínas de unión a tirosina, fibrinógeno o transferrina, confiriendo por lo tanto una semivida aumentada *in vivo* al polipéptido resultante de la invención. De acuerdo con una realización específicamente preferida, dicho resto es una inmunoglobulina de unión a albúmina y, prefiriéndose especialmente, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a albúmina tal como un dominio VHH de unión a albúmina.

Si se destina para su uso en seres humanos, dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a albúmina se une preferiblemente a albúmina de suero humana y preferiblemente es un dominio VHH humanizado de unión a albúmina.

Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina de unión a albúmina de suero humana se conocen en la técnica y se describen con más detalle, por ejemplo, en el documento WO 2006/122786. Específicamente, los VHH de unión a albúmina útiles son ALB 1 y su homólogo humanizado, ALB 8 (documento WO 2009/095489). Sin embargo, también pueden usarse otros dominios VHH de unión a albúmina mencionados en la publicación de patente anterior.

Un dominio VHH de unión a albúmina específicamente útil es ALB8 que consta o contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 98.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, los dos dominios variables sencillos de inmunoglobulina, preferiblemente en los VHH, pueden fusionarse a una molécula de albúmina de suero, como se describe, por ejemplo, en el documento WO01/79271 y en el documento WO03/59934. Como se describe, por ejemplo, en el documento WO01/79271, la proteína de fusión puede obtenerse por tecnología recombinante convencional: una molécula de ADN que codifica la albúmina de suero o un fragmento de la misma, se une al ADN que codifica la molécula de unión a VEGF, la construcción obtenida se inserta en un plásmido adecuado para la expresión en la célula hospedadora seleccionada, por ejemplo una célula de levadura como *Pichia pastoris* o una célula bacteriana y después, la célula hospedadora se transfecta con la secuencia de nucleótidos fusionada y se cultiva en condiciones adecuadas. En la SEC ID Nº: 99 se muestra la secuencia de una HSA útil.

De acuerdo con otra realización, una modificación de un polipéptido de la invención para ampliar la semivida (reduciendo también dicha modificación la inmunogenicidad del polipéptido) comprende la unión de un polímero

198
199

farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) de cadena lineal o ramificada o derivados del mismo (tales como metoxipoli (etilenglicol) o mPEG). Generalmente, puede usarse cualquier forma de PEGilación adecuada, tal como la PEGilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (que incluye, pero sin limitación, anticuerpos de dominio y los scFv); se hace referencia, por ejemplo, a: Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002), Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov. 2 (2003), y al documento WO04/060965.

En el mercado también se encuentran disponibles diversos reactivos para la PEGilación de polipéptidos, por ejemplo, de Nektar Therapeutics, USA, o NOF Corporation, Japón, tal como el Sunbright® EA Series, SH Series, MA Series, CA Series y ME Series, tal como Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA y Sunbright® ME-400MA.

Preferiblemente, se usa la PEGilación dirigida, en particular mediante un resto cisteína (véase, por ejemplo Yang *et. al.*, Protein Engineering 16, 761-770 (2003)). Por ejemplo, para este propósito, PEG puede unirse a un resto cisteína que se produce de origen natural en un polipéptido de la invención, un polipéptido de la invención puede modificarse para introducir adecuadamente uno o más restos cisteína para unirse a PEG o puede fusionarse una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más restos cisteína para unirse a PEG con el extremo N y/o C de un polipéptido de la invención, todo ello usando técnicas de modificación por ingeniería genética de proteínas conocidas de por sí por un experto.

Preferiblemente, para los polipéptidos de la invención, se usa un PEG con un peso molecular superior a 5 kDa, tal como superior a 10 kDa e inferior a 200 kDa, tal como inferior a 100 kDa, por ejemplo en el intervalo de 20 kDa a 80 kDa.

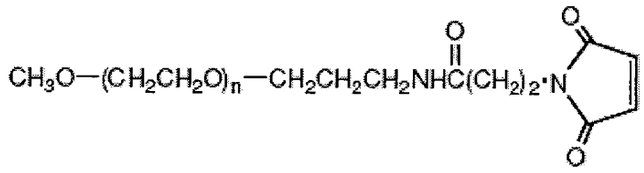
Con respecto a la PEGilación, debe observarse que, generalmente, la invención también incluye cualquier molécula de unión biespecífica que se haya pegilado en una o más posiciones de aminoácidos, preferiblemente de manera que dicha PEGilación (1) aumente la semivida *in vivo*; (2) reduzca la inmunogenicidad; (3) proporcione una o más propiedades beneficiosas adicionales conocidas de por sí para la PEGilación, (4) no afecte esencialmente la afinidad del polipéptido por su diana (por ejemplo no reduzca dicha afinidad en más del 50 % y más preferiblemente no en más del 10%, como se determina por un ensayo adecuado descrito en la técnica); y/o (5) no afecte a ninguna de las otras propiedades deseadas de las moléculas de unión biespecíficas de la invención. Los grupos PEG

AMG 200

y los métodos adecuados para unirlos, específicamente o no específicamente, serán evidentes para el experto. Se encuentran también disponibles en el mercado diversos reactivos para la PEGilación de polipéptidos, por ejemplo, de Nektar Therapeutics, USA o NOF Corporation, Japón, tales como Sunbright® EA Series, SH Series, MA Series, CA Series y ME Series, tales como Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA y Sunbright® ME-400MA.

De acuerdo con una realización especialmente preferida de la invención, un polipéptido PEGilado de la invención incluye un resto PEG de PEG lineal que tiene un peso molecular de 40 kDa o 60 kDa, en el que el resto PEG está unido al polipéptido en una región enlazadora y, específicamente, en un resto Cys en la posición 5 de un péptido enlazador GS9 como se muestra en las SEC ID Nº: 93, en la posición 14 de un péptido enlazador GS27 como se muestra en la SEC ID Nº: 95 o en la posición 15 de un péptido enlazador GS35 como se muestra en la SEC ID Nº: 96 o en la posición 5 de un péptido enlazador 35GS como se muestra en la SEC ID Nº: 97.

Una molécula de unión biespecífica de la invención puede PEGilarse con uno o más reactivos PEG como se ha mencionado anteriormente, tales como "Sunbright® ME-400MA", como se muestra en la siguiente fórmula química:



En la SEC ID Nº: 81 y en la Figura 48 se muestran moléculas de unión biespecíficas que contienen enlazadores y/o grupos funcionales de ampliación de semivida.

De acuerdo con otra realización, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina son anticuerpos de dominio, como se define en la presente memoria.

Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina presentes en las moléculas de unión biespecíficas de la invención también pueden tener secuencias que corresponden a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural que se ha "camelizado", es decir, sustituyendo uno o más restos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable de origen natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional mediante uno o más varios restos aminoacídicos que se producen en la posición (o posiciones)

-ZDD-
201

correspondiente en un dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada. Esto puede realizarse de una manera de por sí conocida, que será evidente para el experto, y se hace referencia adicionalmente al documento WO 94/04678. Dicha camelización puede producirse preferencialmente en las posiciones aminoacídicas que están presentes en la interfaz VH-VL y en los denominados restos Característicos de Camélidos (véase también, por ejemplo, el documento WO 94/04678). Adicionalmente, puede obtenerse una descripción detallada de dichas técnicas de "humanización" y "camelización" y secuencias de región flanqueante preferidas, de acuerdo con éstas, en la página 46 y en la página 98 del documento WO 2006/040153 y en la página 107 del documento WO 2006/122786.

Las moléculas de unión tienen especificidad para Dll4 o VEGF, respectivamente, ya que comprenden uno o más dominios variables sencillos de inmunoglobulina que se unen específicamente a uno o más epítopos dentro de la molécula de Dll4 o dentro de la molécula de VEGF, respectivamente.

La unión específica de una molécula de unión a su antígeno Dll4 o VEGF puede determinarse de cualquier manera adecuada de por sí conocida, que incluye, por ejemplo, los ensayos descritos en la presente memoria, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA y ELISA) y ensayos de competencia de tipo sándwich y las diferentes variantes de estos conocidas de por sí en la técnica.

Con respecto al antígeno Dll4 o VEGF, respectivamente, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina no está limitado con respecto a la especie. Por lo tanto, si se destinan para fines terapéuticos en seres humanos, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina se unen preferiblemente a Dll4 de ser humano o a VEGF de ser humano, respectivamente. Sin embargo, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina que se unen a Dll4 o a VEGF, respectivamente, de otras especies de mamíferos, o a polipéptidos que los contienen, también se encuentran dentro del alcance de la invención. Un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une a una especie de Dll4 o VEGF puede presentar reacción cruzada con el antígeno respectivo de una o más especies distintas. Por ejemplo, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina que se unen al antígeno humano pueden mostrar reactividad cruzada con el antígeno respectivo de una o más especies distintas de primates y/o con el antígeno de una o más especies de animales que se usan en modelos animales para enfermedades, por ejemplo mono (en particular Cynomolgo o Rhesus), ratón,

rata, conejo, cerdo, perro y en particular en modelos animales para enfermedades y trastornos que pueden modularse por inhibición de Dll4 (tales como las especies y modelos animales mencionados en la presente memoria). Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina de la invención que muestran dicha reactividad cruzada son ventajosos en una investigación y/o desarrollo farmacológico, ya que esto permite que los dominios variables sencillos de inmunoglobulina de la invención se ensayen en modelos de enfermedades reconocidos tales como monos, en particular, Cynomolgo o Rhesus o ratones y ratas.

Además, las moléculas de unión no están limitadas o definidas por un dominio específico o un determinante antigénico del antígeno contra el cual están dirigidas. Preferiblemente, a la vista de la reactividad cruzada con una o más moléculas de antígeno de especies distintas a seres humanos que está/o están destinadas para su uso como un modelo animal durante el desarrollo de un antagonista terapéutico de Dll4/VEGF, una molécula de unión reconoce un epítopo en una región del antígeno respectivo que tiene un alto grado de identidad con el antígeno humano. A modo de ejemplo, a la vista del uso de un modelo de ratón, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-Dll4 contenido en las moléculas de unión biespecíficas de la invención reconoce un epítopo que se localiza, totalmente o en parte, dentro del dominio EGF-2 de Dll4, que muestra una alta identidad entre ser humano y ratón.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida, la molécula de unión biespecífica de la invención comprende una molécula de unión a Dll4 que es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se selecciona del grupo que se une a un epítopo contenido total o parcialmente dentro del dominio EGF 2 que corresponde a los restos aminoacídicos 252-282 de la SEC ID Nº: 101.

Si una molécula de unión biespecífica de la invención contiene una molécula de unión a Dll4 biparatópica, que contiene más de un dominio variable sencillo de inmunoglobulina, al menos uno de los componentes del dominio variable sencillo de inmunoglobulina se une al epítopo dentro del dominio EGF-2, como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, el componente de unión a VEGF se une a las isoformas de VEGF, VEGF165 y/o VEGF121.

Preferiblemente, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que es un componente de una molécula de unión biespecífica de la invención se une a Dll4 o a VEGF, respectivamente, con una afinidad inferior a 500 nM, preferiblemente inferior a 200 nM, más preferiblemente inferior a 10 nM, tal como inferior a 500 pM

702
703

(como se determina por análisis de Resonancia de Plasmón Superficial, como se describe en el Ejemplo 5.7).

Preferiblemente, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina contenidos en las moléculas de unión biespecíficas de la invención tienen valores CI_{50}, medidos en un ensayo de competición ELISA como se describe en el Ejemplo 5.1, en el intervalo de 10^{-6} a 10^{-10} moles/litro o inferior, más preferiblemente en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-10} moles/litro o inferior e incluso más preferiblemente en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-10} moles/litro o inferior.

De acuerdo con una realización preferida, pero no limitante, de la invención, los dominios variables sencillos de inmunoglobulina que se unen a Dll4 o VEGF contenidos en las moléculas de unión biespecíficas de la invención se unen a Dll4 o VEGF, respectivamente, con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro (M) o inferior, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro (M) o inferior y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (M), y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos 10^7 M^{-1}, preferiblemente al menos 10^8 M^{-1}, más preferiblemente al menos 10^9 M^{-1}, tal como al menos 10^{12} M^{-1} y en particular con una K_D inferior a 500 nM, preferiblemente inferior a 200 nM, más preferiblemente inferior a 10 nM, tal como inferior a 500 pM. Pueden determinarse los valores K_D y K_A del dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la invención frente a Dll4.

En otro aspecto, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de unión biespecíficas de la invención. Dichas moléculas de ácido nucleico se denominarán también en la presente memoria "ácidos nucleicos de la invención" y también pueden estar en forma de una construcción genética, como se define en la presente memoria. Un ácido nucleico de la invención puede ser ADN genómico, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codón que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula hospedadora u organismo hospedador deseado). De acuerdo con una realización de la invención, el ácido nucleico de la invención está en forma esencialmente aislada, como se ha definido anteriormente en la presente memoria.

El ácido nucleico de la invención también puede estar en forma de, puede estar presente en y/o puede ser parte de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido o YAC. El vector puede ser especialmente un vector de expresión, es decir un vector que puede proporcionar la expresión de la molécula de unión a Dll4 *in vitro* y/o *in vivo* (es decir, en una célula hospedadora, organismo hospedador y/o sistema de expresión adecuado). Dicho vector de expresión

generalmente comprende al menos un ácido nucleico de la invención que está unido operativamente a uno o más elementos reguladores adecuados, tales como un promotor (o promotores), un potenciador (o potenciadores), un terminator (o terminadores) y similares. Dichos elementos y su selección, a la vista de la expresión de una secuencia específica en un hospedador específico, son de conocimiento común para el experto. Por ejemplo, en las páginas 131 a 133 del documento WO 2006/040153, se describen ejemplos específicos de elementos reguladores y otros elementos útiles o necesarios para expresar moléculas de unión a Dll4 de la invención, tales como promotores, potenciadores, terminadores, factores de integración, marcadores de selección, secuencias líder, genes indicadores, y similares.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse u obtenerse de una manera de por sí conocida (por ejemplo, por síntesis de ADN automatizada y/o tecnología de ADN recombinante), basándose en la información de las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención proporcionados en la presente memoria y/o pueden aislarse de una fuente natural adecuada.

En otro aspecto, la invención se refiere a células hospedadoras que expresan o que son capaces de expresar una o más moléculas de unión biespecíficas de la invención y/o que contienen un ácido nucleico de la invención. De acuerdo con una realización particularmente preferida, dichas células hospedadoras son células bacterianas; otras células útiles son células de levadura, células fúngicas o células de mamíferos.

Las células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas bacterianas gram-negativas, tales como cepas de *Escherichia coli, Proteus y Pseudomonas* y cepas bacterianas gram-positivas tales como cepas de *Bacillus, Streptomyces, Staphylococcus* y *Lactococcus*. Las células fúngicas adecuadas incluyen células de especies de *Trichoderma, Neurospora* y *Aspergillus*. Las células de levadura adecuadas incluyen células de las especies de *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*.

Las células de mamífero adecuadas incluyen por ejemplo células CHO, células BHK, células HeLa, células COS y similares. Sin embargo, también pueden usarse células de anfibios, células de insectos, células vegetales y cualquier otras células usadas en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas.

2091

205

La invención proporciona adicionalmente métodos de fabricación de una molécula de unión biespecífica de la invención, dichos métodos generalmente comprenden las etapas de:

- cultivar células hospedadoras que comprenden un ácido nucleico capaz de codificar una molécula de unión biespecífica en condiciones que permitan la expresión de la molécula de unión biespecífica de la invención; y
- recuperar o aislar del cultivo, el polipéptido expresado por las células hospedadoras; y
- opcionalmente purificar y/o modificar y/o formular adicionalmente la molécula de unión biespecífica de la invención.

Para la producción a escala industrial, los organismos hospedadores preferidos incluyen cepas de *E. coli, Pichia pastoris* y *S. cerevisiae* que son adecuados para la expresión, producción y fermentación a gran escala y en particular para la expresión producción y fermentación farmacéutica a gran escala.

La elección del sistema de expresión específico depende en parte de las necesidades para determinadas modificaciones post-traduccionales, más específicamente glicosilación. La producción de una molécula de unión biespecífica de la invención para la que se desea o se requiere la glicosilación, se necesitaría el uso de hospedadores de expresión mamíferos que tuvieran la capacidad de glicosilar a la proteína expresada. En este sentido, el experto en la técnica tendrá claro que el modelo de glicosilación obtenido (es decir, el tipo, número y posición de restos unidos) dependerá de la célula o de la línea celular que se usa para la expresión.

La moléculas de unión biespecíficas de la invención pueden producirse en una célula, como se ha indicado anteriormente, intracelularmente (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma o en cuerpos de inclusión) y después aislarse de las células hospedadoras y opcionalmente, además, purificarse o pueden producirse extracelularmente (por ejemplo, en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras) y después aislarse del medio de cultivo y opcionalmente, además purificarse.

En la técnica se conocen métodos y reactivos usados para la producción recombinante de polipéptidos, tales como vectores de expresión, métodos de transformación o transfección, marcadores de selección, métodos de inducción de expresión de proteínas, condiciones de cultivo y similares adecuados. De manera similar, el experto conoce bien las técnicas de aislamiento y purificación de

205

206

proteínas útiles en un método de fabricación de un polipéptido de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N^{os}: 1 a 166, SEC ID N^{os}: 333 a 353 o SEC ID N^{os}: 375 a 395, respectivamente y a una molécula de ácido nucleico que le codifica.

Estos péptidos corresponden a las CDR3 derivadas de los VHH de la invención. Éstos son útiles, en particular las moléculas de ácido nucleico que los codifican, para injertar CDR, con objeto de sustituir una CDR3 en una cadena de inmunoglobulina o para la inserción dentro de un armazón que no es de inmunoglobulina, por ejemplo un inhibidor de proteasa, una proteína de unión a ADN, citocromo b562, una proteína de paquete-hélice, un péptido con puentes disulfuro, una lipocalina o una anticalina, confiriendo de esta manera a dicho armazón las propiedades de unión a la diana. El método de injerto CDR se conoce bien en la técnica y se ha usado ampliamente, por ejemplo para la humanización de anticuerpos (que habitualmente comprende injertar las CDR de un anticuerpo de roedor sobre los armazones Fv de un anticuerpo humano).

Para obtener un armazón de inmunoglobulina o de no inmunoglobulina que contenga una CDR3 de la invención, el ADN que codifica dicha molécula puede obtenerse de acuerdo con métodos convencionales de biología molecular, por ejemplo, por síntesis génica, por hibridación de oligonucleótidos o por medio de solapamiento de fragmentos de PCR, como describen, por ejemplo, Daugherty *et al.*, 1991, Nucleic Acids Research, vol. 19, 9, 2471 - 2476. Nicaise *et al.*, 2004, Protein Science, 13, 1882 – 1891, han descrito un método para insertar una CDR3 de VHH en un armazón que no es inmunoglobulina.

La invención se refiere adicionalmente a un producto o composición que contiene o que comprende al menos una molécula de unión biespecífica de la invención y opcionalmente uno o más componentes adicionales de dichas composiciones conocidas de por sí, es decir denpendiendo del uso o pretendido de la composición.

Para el uso farmacéutico, una molécula de unión biespecífica de la invención o un polipéptido que la contiene puede formularse como una preparación o composición farmacéutica que comprenda al menos una molécula de unión biespecífico de la invención y al menos un transportador, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Mediante ejemplos no

limitantes, dicha formulación puede estar en una forma adecuada para la administración oral, para la administración parenteral (tal como por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica, para la administración por inhalación, por un parche dérmico, por un implante, por un supositorio, etc. Dichas formas de administración adecuadas - que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la manera de la administración - así como métodos y transportadores para su uso en la preparación de las mismas, serán evidentes para el experto y se describen adicionalmente en la presente memoria.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión biespecífica, en particular, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la invención o un polipéptido que contiene el mismo y al menos un transportador, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para el uso farmacéutico) y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

Las moléculas de unión biespecíficas de la invención puede formularse y administrarse de una manera adecuada de por sí conocida: para los dominios variables sencillos de inmunoglobulina en particular se hace referencia, por ejemplo, a los documentos WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 y WO 08/020079, así como a los manuales convencionales, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Company, USA. (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, Lippincott Williams y Wilkins (2005), o the Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (véanse por ejemplo las páginas 252-255).

Por ejemplo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la invención puede formularse y administrarse de cualquier manera de por sí conocida para anticuerpos convencionales y fragmentos de anticuerpos (incluyendo los scFv y diacuerpos) y otras proteínas farmacéuticamente activas. Dichas formulaciones y métodos para preparar los mismos serán evidentes para el experto en la materia y por ejemplo incluyen preparaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intraarterial o intratecal) o tópica (es decir, administración transdérmica o intradérmica).

Para la administración parenteral las preparaciones pueden ser, por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que son

207
208

adecuadas para infusión o inyección. Los transportadores o diluyentes adecuados para dichas preparaciones incluyen, por ejemplo, sin limitación, agua estéril y tampones y soluciones acuosas farmacéuticamente aceptables tales como solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución dextrosa y solución de Hank; aceites en agua; glicerol; etanol; glicoles tales como propilen glicol o también aceites minerales, aceites animales y aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja así como mezclas adecuadas de los mismos. Habitualmente, las soluciones o suspensiones acuosas serán las preferidas.

Por lo tanto, la molécula de unión biespecífica de la invención puede administrarse por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. Para la administración terapéutica oral, la molécula de unión biespecífica de la invención puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos un 0,1% de la molécula de unión biespecífica de la invención. Por supuesto, en las composiciones y preparaciones este porcentaje puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente de un 2 a un 60% del peso de una forma farmacéutica unitaria proporcionada. La cantidad de la molécula de unión biespecífica de la invención en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes y edulcorantes o saporíferos, por ejemplo los mencionados en las páginas 143-144 del documento WO 08/020079. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, ésta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un transportador líquido, tal como un aceite vegetal o polietilen glicol. Diversos materiales distintos pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la forma farmacéutica unitaria sólida. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similar. Un jarabe o elixir puede contener las moléculas de unión biespecíficas de la invención, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un saporífero tal como sabor a cereza o naranja. Por

supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma farmacéutica unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, las moléculas de unión biespecíficas de la invención pueden incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación prolongada.

Las preparaciones y formulaciones para la administración oral también pueden proporcionarse con un recubrimiento entérico que permitirá que las construcciones de la invención resistan el medio gástrico y pasen al intestino. Más generalmente, las preparaciones y formulaciones para la administración oral pueden formularse adecuadamente para el suministro dentro de cualquier parte deseada del tracto gastrointestinal. Además, pueden usarse supositorios adecuados para administración al interior del tracto gastrointestinal.

Las moléculas de unión biespecíficas de la invención también pueden administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección, como se describe adicionalmente en las páginas 144 y 145 del documento WO 08/020079.

Para la administración tópica de las moléculas de unión biespecíficas de la invención, será generalmente deseable administrarlas en la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un transportador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido, como se describe adicionalmente en la página 145 del documento WO 08/020079.

Generalmente, la concentración de las moléculas de unión biespecíficas de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente 0,1-25% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semi-sólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente 0,1-5% en peso, preferiblemente aproximadamente 0,5-2,5% en peso.

La cantidad de las moléculas biespecíficas de la invención requeridas para su uso en el tratamiento variará no solamente con la molécula de unión biespecífica seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección a tratar y la edad y estado del paciente y será en última instancia según el criterio del médico o especialista clínico tratante. Además, la dosificación de las moléculas de unión biespecíficas de la invención varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto u órgano diana.

La cantidad deseada puede presentarse convenientemente en una sola dosis o en dosis divididas administras a intervalos apropiados, por ejemplo, como

dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis puede dividirse además, por ejemplo, en una serie de administraciones específicas ligeramente separadas; tales como inhalaciones múltiples desde un insuflador o por aplicación de una pluralidad de gotas oculares.

Un régimen de administración puede incluir tratamiento diario a largo plazo. Por "largo plazo" se refiere al menos dos semanas y preferiblemente, algunas semanas, meses o años de duración. Un experto en la materia puede determinar las modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación usando únicamente experimentación rutinaria dadas las enseñanzas de la presente memoria. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, EW, ed. 4), Mack Co. Publishing, Easton, PA. En caso de cualquier complicación cada médico también puede ajustar la dosificación.

De acuerdo con una realización adicional, la invención se refiere al uso de moléculas de unión biespecíficas, por ejemplo, dominios variables sencillos de inmunoglobulina o polipéptidos que los contienen, para propósitos terapéuticos, tales como

- para la prevención, tratamiento y/o alivio de un trastorno, enfermedad o afección, especialmente en un ser humano, que está asociado con efectos mediados por Dll4 sobre la angiogénesis o que puede prevenirse, tratarse o aliviarse modulando la ruta de señalización Notch con una molécula de unión a Dll4,
- en un método de tratamiento de un paciente que necesita dicha terapia, comprendiendo dicho método administrar, al sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una molécula de unión biespecífica de la invención, por ejemplo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina o una composición farmacéutica que le contenga;
- para la preparación de un medicamento para la prevención, tratamiento o alivio de trastornos, enfermedades o afecciones asociadas con efectos mediados por Dll4 sobre la angiogénesis;
- como un ingrediente activo en una composición farmacéutica o medicamento usado para los propósitos anteriores.

De acuerdo con un aspecto específico, dicho trastorno, enfermedad o afección es una enfermedad por cáncer o cancerosa, como se define en la presente memoria.

De acuerdo con otro aspecto, la enfermedad es una enfermedad ocular asociada con efectos mediados por Dll4 sobre la angiogénesis o que puede tratarse

o aliviarse modulando la ruta de señalización Notch con una molécula de unión a Dll4.

Dependiendo de la enfermedad cancerosa a tratar, puede usarse una molécula de unión biespecífica de la invención por su propia cuenta o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en particular seleccionados de agentes quimioterapéuticos tales como agentes perjudiciales para el ADN o compuestos terapéuticamente activos que inhiban la angiogénesis, rutas de transducción de señal o puntos de control mitóticos en células cancerosas.

El agente terapéutico adicional puede administrarse simultáneamente con, opcionalmente como un componente de la misma preparación farmacéutica, o antes o después de la administración de la molécula de unión biespecífica.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser, sin limitación (y en el caso de los receptores, incluyendo los respectivos ligandos), uno o más inhibidores seleccionados del grupo de inhibidores de EGFR, VEGFR, HER2-neu, Her3, AuroraA, AuroraB, PLK y PI3 quinasa, FGFR, PDGFR, Raf, KSP, PDK1, PTK2, IGF-R o IR.

Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales son inhibidores de CDK, Akt, src/bcr abl, cKit, CMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, antagonistas de hedgehog, inhibidores de JAK/STAT, Mek, mTOR, NFkappaB, proteasoma, Rho, un inhibidor de la señalización wnt o un inhibidor de la ruta de ubiquitinación u otro inhibidor de la ruta de señalización Notch.

Son ejemplos de inhibidores de Aurora, sin limitación, PHA-739358, AZD-1152, AT 9283, CYC-116, R-763, VX-680, VX-667, MLN-8045, PF-3814735.

Un ejemplo de un inhibidor de PLK es GSK-461364.

Son ejemplos de inhibidores de raf BAY-73-4506 (también un inhibidor de VEGFR), PLX 4032, RAF-265 (también además un inhibidor de VEGFR), sorafenib (también además un inhibidor de VEGFR) y XL 281.

Son ejemplos de inhibidores KSP, spinesib, ARRY-520, AZD-4877, CK 1122697, GSK 246053A, GSK-923295, MK-0731 y SB-743921.

Son ejemplos de inhibidores de src y/o de bcr-abl, dasatinib, AZD-0530, bosutinib, XL 228 (también un inhibidor de IGF-1R), nilotinib (también un inhibidor de PDGFR y de cKit), imatinib (también un inhibidor de cKit) y NS-187.

Un ejemplo de un inhibidor de PDK1 es BX-517.

Un ejemplo de un inhibidor de Rho es BA-210.

Son ejemplos de inhibidores de quinasa PI3, PX-866, BEZ-235 (también un

inhibidor de mTor), XL 418 (también un inhibidor de Akt), XL-147 y XL 765 (también un inhibidor de mTor.

Son ejemplos de inhibidores de cMer o de HGF, XL-184 (también un inhibidor de VEGFR, de cKit, de Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (también un inhibidor de VEGFR), MGCD-265 (también un inhibidor de VEGFR, de Ron, de Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102 y AV-299.

Un ejemplo de un inhibidor de c-Myc es CX-3543.

Son ejemplos de inhibidores de Flt3, AC-220 (también un inhibidor de cKit y de PDGFR), KW 2449, lestaurtinib (también un inhibidor de VEGFR, de PDGFR, de PKC), TG-101348 (también un inhibidor de JAK2), XL-999 (también un inhibidor de cKit, de FGFR, de PDGFR y de VEGFR) sunitinib (también un inhibidor de PDGFR, de VEGFR y de cKit) y tandutinib (también un inhibidor de PDGFR y de cKit).

Son ejemplos de inhibidores de HSP90, tanespimicina, alvespimicina, IPI-504 y CNF 2024.

Son ejemplos de inhibidores de JAK/STAT, CYT-997 (que también interacciona con tubulina), TG 101348 (también un inhibidor de Flt3) y XL-019.

Son ejemplos de inhibidores de Mek, ARRY-142886, PD-325901, AZD-8330 y XL 518.

Son ejemplos de inhibidores de mTor, temsirolimus, AP-23573 (que también actúa como un inhibidor de VEGF), everolimus (además un inhibidor de VEGF). XL-765 (también un inhibidor de PI3 quinasa) y BEZ-235 (también un inhibidor de PI3 quinasa).

Son ejemplos de inhibidores de Akt, perifosina, GSK-690693, RX-0201 y triciribina.

Son ejemplos de inhibidores de kit, AB-1010, OSI-930 (que también actúa como un inhibidor de VEGFR), AC-220 (también un inhibidor de Flt3 y de PDGFR), tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y de PDGFR), axitinib (también un inhibidor de VEGFR y de PDGFR), XL-999 (también un inhibidor de Flt3, de PDGFR, de VEGFR, de FGFR), sunitinib (también un inhibidor de Flt3, de PDGFR, de VEGFR) y XL-820 (que también actúa como un inhibidor de VEGFR y de PDGFR), imatinib (también un inhibidor de bcr-abl), nilotinib (también un inhibidor de bcr-abl y de PDGFR).

Son ejemplos de antagonistas de hedgehog, IPI-609 y CUR-61414.

Son ejemplos de inhibidores de CDK, seliciclib, AT-7519, P-276, ZK-CDK (que también inhibe VEGFR2 y PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-

690509 y AG 024322.

Son ejemplos de inhibidores de proteasoma, bortezomib, carfilzomib y NPI-0052 (también un inhibidor de NFkappaB).

Un ejemplo de un inhibidor de la ruta NFkappaB es NPI-0052.

Un ejemplo de un inhibidor de la ruta de ubiquitinación es HBX-41108.

En realizaciones preferidas, el agente terapéutico adicional es un agente anti-angiogénico.

Son ejemplos de agentes anti-angiogénicos los inhibidores de FGFR, de PDGFR y de VEGFR o sus ligandos respectivos (por ejemplo, inhibidores de VEGF como pegaptanib o el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab) y las talidomidas, seleccionándose dichos agentes, sin limitación, de bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU- 14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (también un inhibidor de CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiD (fármacos inmunomoduladores), derivados de talidomida CC-4047, lenalidomida, ENMD 0995, IMC-D11, Ki 23057, brivanib, cediranib, XL-999 (también un inhibidor de cKit y de Flt3), 1B3, CP 868596, IMC 3G3, R-1530 (también un inhibidor de Flt3), sunitinib (un inhibidor de cKit y de Flt3), axitinib (también un inhibidor de cKit), lestaurtinib (también un inhibidor de Flt3 y de PKC), vatalanib, tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y de cKit), pazopanib, GW 786034, PF-337 210, IMC-1121B, AVE-0005, AG-13736, E-7080, CHIR 258, tosilato de sorafenib (también un inhibidor de Raf), RAF-265 (también un inhibidor de Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (también un inhibidor de EGFR y de Her2), BAY-57-9352 (también un inhibidor de Raf), BAY-73-4506 (también un inhibidor de Raf), XL 880 (también un inhibidor de cMet), XL-647 (un inhibidor de EGFR y de EphB4), XL 820 (también un inhibidor de cKit) y nilotinib (también un inhibidor de cKit y de brc-abl).

El agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de inhibidores de EGFR, puede ser un inhibidor de EGFR de pequeña molécula o un anticuerpo anti-EGFR. Son ejemplos de anticuerpos anti-EGFR, sin limitación, cetuximab, panitumumab, matuzumab; un ejemplo de un inhibidor de EGFR de pequeña molécula es gefitinib. Otro ejemplo de un modulador de EGFR es la toxina de fusión EGF.

Entre los inhibidores de EGFR y de Her2 útiles para combinar con la molécula de unión biespecífica de la invención están lapatinib, gefitinib, erlotinib, cetuximab, trastuzumab, nimotuzumab, zalutumumab, vandetanib (un inhibidor de VEGFR), pertuzumab, XL-647, HKI-272, BMS-599626 ARRY-334543, AV 412,

mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (también un inhibidor de VEGFR), ARRY- 333786, IMC-11F8, Zemab.

Otros agentes que pueden combinarse ventajosamente en una terapia con la molécula de unión biespecífica de la invención son tositumumab e ibritumomab tiuxetan (dos anticuerpos anti-CD20 radiomarcados), alemtuzumab (un anticuerpo anti-CD52), denosumab, (un inhibidor del ligando del factor de diferenciación osteoclástico), galiximab (un antagonista de CD80), ofatumumab (un inhibidor de CD20), zanolimumab (un antagonista de CD4), SGN40 (un modulador del receptor de ligando CD40), rituximab (un inhibidor de CD20) o mapatumumab (un agonista del receptor TRAIL-1).

Otros fármacos quimioterapéuticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de unión biespecíficas de la presente invención se seleccionan, pero sin limitación, de hormonas, análogos de hormonas y antihormonales (por ejemplo, tamoxifen, toremifene, raloxifene, fulvestrant, acetato de megestrol, flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona, finasterida, acetato de buserelina, fludrocortisona, fluoximesterona, medroxiprogesterona, octreotida, arzoxifene, pasireotida, vapreotida), inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, liarozol, exemestano, atamestano, formestano), agonistas y antagonistas de LHRH (por ejemplo, acetato de goserelina, leuprolida, abarelix, cetrorelix, desloresina, histrelina, triptorelina), antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos como metotrexato, pemetrexed, análogos de pirimidina como 5-fluorouracil, capecitabina, decitabina, nelarabina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina tales como mercaptopurina tioguanina, cladribina y pentostatina, citarabina, fludarabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idarrubicina, mitomicina-C, bleomicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, pixantrona, estreptozocina); derivados de platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, lobaplatino, satraplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, estramustina, mecloretamina, melfalán, clorambucil, busulfán, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, hidroxiurea, temozolomida, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimitóticos (por ejemplo, vinca alcaloides como vinblastina, vindesina, vinorelbina, vinflunina y vincristina; y taxanos como paclitaxel, docetaxel y sus formulaciones, larotaxel; simotaxel y epotilonas como ixabepilona, patupilona, ZK-EPO), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y etopofos, tenipósido, amsacrina, topotecán, irinotecán) y agentes quimioterapéuticos

misceláneos tales como amifostina, anagrelida, alfa interferon, procarbazina, mitotano y porfimer, bexarotene, celecoxib.

La eficacia de las moléculas de unión biespecíficas de la invención o polipéptidos que las contienen y las composiciones que comprenden a los mismos, pueden ensayarse usando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido de por sí, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o trastorno específico de interés. Los ensayos y modelos animales adecuados serán evidentes para el experto e incluyen, por ejemplo, los ensayos descritos en la presente memoria y usados en los siguientes ejemplos, por ejemplo un ensayo de proliferación.

Breve descripción de las Figuras:

Figura 1: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de DLL4 de ser humano, Rhesus y Cinomolgo.

Figura 2: Mutantes por delección de DLL4 de ser humano y ratón (delimitaciones de los dominios de aminoácidos en superíndice).

Figura 3: VHH purificados bloqueando la interacción hDLL4/hNotch1-Fc (ELISA).

Figura 4: VHH purificados bloqueando la interacción hDLL4/hNotch1-Fc (AlphaScreen).

Figura 5: VHH purificados bloqueando la interacción CHO-hDLL4/hNotch1-Fc y CHO-mDLL4/hNotch1-Fc (FMAT).

Figura 6: VHH purificados bloqueando la escisión de Notch1 mediada por DLL4 (indicador).

Figura 7: Unión de los VHH purificados con DLL4 recombinante de ser humano y ratón (ELISA).

Figura 8: Unión de los VHH purificados con DLL1 recombinante de ser humano y Jagged-1 de ser humano (ELISA).

Figura 9: Unión de los VHH purificados con DLL4 de ser humano/ratón/mono cynomolgo (FACS).

Figura 10: VHH madurados por afinidad bloqueando la interacción hDLL4/hNotch1-Fc (ELISA).

Figura 11: VHH madurados por afinidad la interacción CHO-hDLL4/hNotch1-Fc y CHO-mDLL4/hNotch1-Fc (FMAT).

Figura 12: Unión de los VHH purificados con DLL4 de ser humano/ratón (ELISA).

Figura 13: Unión de los VHH purificados madurados por afinidad con DLL1 de ser humano recombinante y Jagged-1 de ser humano (ELISA).

Figura 14: Unión de los VHH purificados con DLL4 de ser humano/ratón/cynomolgo (FACS).

Figura 15: Evaluación de los efectos de los VHH sobre la inhibición mediada por Dll4 de la proliferación de HUVEC.

Figura 16: VHH madurados por afinidad en un ensayo indicador mediado por DLL4

Figura 17: A) Alineamiento de secuencia de DLLBII129B05 de VHH con respecto a la secuencia de la línea germinal humana VH3/JH.

B) Alineamiento de secuencia de DLLBII136C07 de VHH con respecto a la secuencia de la línea germinal humana VH3/JH5.

Figura 18: A) Variantes de VHH purificadas de secuencia optimizada de DLLBII129B05 bloqueando la interacción CHO-hDLL4/hNotch1-Fc y CHO-mDLL4/hNotch1-Fc (FMAT).

B) Variantes de VHH purificadas de secuencia optimizada de DLLBII136C07 bloqueando la interacción CHO-hDLL4/hNotch1-Fc y CHO-mDLL4/hNotch1-Fc (FMAT).

Figura 19: VHH purificados de secuencia optimizada bloqueando la escisión de Notch1 mediada por DLL4 (ensayo indicador).

Figura 20: VHH monovalentes purificados bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR2-Fc (ELISA).

Figura 21: VHH monovalentes purificados bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR1-Fc (ELISA).

Figura 22: VHH monovalentes purificados bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen).

Figura 23: VHH monovalentes purificados bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR1-Fc (AlphaScreen).

Figura 24: Unión de los VHH monovalentes a VEGF recombinante de ser humano y de ratón (ELISA).

Figura 25: Unión de los VHH monovalentes a VEGFF121 de ser humano.

Figura 26: VHH purificados no unidos a VEGFB, VEGFC, VEGFD y PlGF.

Figura 27: VHH formateados bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR2-Fc (ELISA).

Figura 28: VHH formateados bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR1-Fc

(ELISA).

Figura 29: VHH formateados bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen).

Figura 30: VHH formateados bloqueando la interacción VEGF165/hVEGFR1-Fc (AlphaScreen).

Figura 31: VHH formateados bloqueando la interacción VEGF164/mVEGFR2-Fc (AlphaScreen).

Figura 32: VHH formateados unidos a VEGF de ratón y ser humano.

Figura 33: VHH formateados no unidos a VEGFB, VEGFC, VEGFD y PlGF

Figura 34: VHH formateados unidos a VEGF121.

Figura 35: Alineamiento de secuencia de VEGFBII23B04 de VHH con la secuencia consenso de la línea germinal humana VH3/JH.

Figura 36: Variantes de VHH de VEGFBII23B4 bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen).

Figura 37: Clones de VEGFBII23B4 de secuencia optimizada bloqueando la interacción hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen).

Figura 38: Alineamiento de secuencia de VEGFBII5B5 de VHH con la secuencia consenso de la línea germinal humana VH3/JH.

Figura 39: Formato de los VHH de VEGF-DLL4 biespecíficos de ciclo 1.

Figura 40: Formato de los VHH de VEGF-DLL4 biespecíficos de ciclo 2.

Figura 41: VHH biespecíficos (ciclo 1) en el ensayo AlphaScreen de VEGF/VEGFR2 (en presencia o ausencia de 5 μM de HSA).

Figura 42: VHH biespecíficos (ciclo 1) en el ensayo AlphaScreen de VEGF/VEGFR1 (en presencia o ausencia de 5 μM de HSA).

Figura 43: VHH biespecíficos (ciclo 1) en el ensayo FMAT de CHO-hDLL4/hNotch1-Fc (en presencia o ausencia de 25 μM de HSA).

Figura 44: VHH biespecíficos (ciclo 2) en el ensayo AlphaScreen de VEGF/VEGFR2 (en presencia o ausencia de 5 μM de HSA).

Figura 45: VHH biespecíficos (ciclo 2) en el ensayo AlphaScreen de VEGF/VEGFR1 (en presencia o ausencia de 5 μM de HSA).

Figura 46: VHH biespecíficos (ciclo 2) en el ensayo FMAT de CHO-hDLL4/hNotch1-Fc y CHO-mDLL4/hNotch1-Fc (en presencia o ausencia de 25 μM de HSA).

Figura 47: VHH biespecíficos (ciclo 2) en el ensayo indicador mediado por DLL4 (en presencia o ausencia de 175 μM de HSA).

Figura 48: Formato de los VHH de VEGF-DLL4 biespecíficos de secuencia optimizada.

Figura 49: VHH biespecíficos (ciclo 3) en el ensayo AlphaScreen de VEGF/VEGFR2 (en presencia o ausencia de 5 μM de HSA).

Figura 50: VHH biespecíficos (ciclo 3) en el ensayo AlphaScreen de VEGF/VEGFR1 (en presencia o ausencia 5 de μM de HSA).

Figura 51: VHH biespecíficos (ciclo 3) en el ensayo FMAT de CHO-hDLL4/hNotch1-Fc y CHO-mDLL4/hNotch1-Fc (en presencia o ausencia 25 de μM de HSA).

Figura 52: Eficacia de los VHH seleccionados en un modelo de ratón de cáncer de colon humano (modelo SW620)

A: Cinética del crecimiento del tumor SW620

B: Volúmenes absolutos tumorales al final del estudio el día 21

C: cambio de peso corporal a lo largo del tiempo.

Materiales y Métodos

a) Generación de líneas de células CHO y HEK293 que sobreexpresan Dll4 de ser humano, ratón y cinomolgo.

Se amplificaron los ADNc que codifican Dll4 de ser humano (SEC ID Nº: 101; NM_019074.2) y ratón (NM_019454.3) a partir de una genoteca de ADNc de tejido cardiaco de ser humano normal adulto (BioChain, Hayward, CA, USA) y de una genoteca de ADNc de tejido cardiaco de ratón (aislado de la cepa C57/B16), respectivamente, usando oligonucleótidos diseñados en la UTR 5' y 3' de la secuencia correspondiente. Los amplicones se clonaron en el vector de expresión mamífero pCDNA3.1(+)-neo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

El ADNc de Dll4 de mono Cinomolgo se amplificó a partir de una genoteca de ADNc de tejido cardiaco normal de Cinomolgo (BioChain, Hayward, CA, USA), usando cebadores diseñados en la UTR 5' y 3' de la secuencia codificante Dll4 de la especie Rhesus íntimamente relacionada (Dll4 de *Macaca mulatta*, SEC ID Nº:102; XM_001099250.1) (véase la Figura 1). El amplicón final se clonó en el vector de expresión mamífero pCDNA3.1(+)-neo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La secuencia de aminoácidos de Dll4 de cinomolgo se muestra como 100% idéntica a la de rhesus y 99% idéntica a la de ser humano (véase la Figura 1; las diferencias de la secuencia de ser humano se indican subrayadas en negrita).

Para establecer las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que

sobreexpresan Dll4 de ser humano, Dll4 de ratón o Dll4 de mono cinomolgo, se realizó la electroporación de células CHO parentales con pCDNA3.1(+)-neo-hDll4, pcDNA3.1(+)-neo-mDll4 o pcDNA3.1(+)-neo-cDll4, respectivamente. Se generaron células embrionarias humanas de riñón (HEK293) que sobreexpresaban Dll4 de ser humano y Dll4 de ratón por transfección mediada por lípidos con Fugene (Roche) de plásmidos pCDNA3.1(+)-neo-hDll4 o mDll4, respectivamente, en la línea celular parental de HEK293. Para todas las condiciones, los transfectantes se seleccionaron por adición de 1 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

b) Generación de IgG anti-Dll4 monocolonal y fragmento Fab

En el documento US 2008/0014196 (Genentech) se describe un mAb de Dll4 de reactividad cruzada de ser humano/ratón usado por Ridgway *et al.* (2006) para demostrar los efectos aditivos de mAb de VEGF4 y mAb de Dll4 sobre el crecimiento tumoral en una serie de modelos de xenoinjerto. Este mAb anti-Dll4 y su Fab correspondiente se purificaron para ensayar las propiedades de este anticuerpo (fragmento) en ensayos bioquímicos/celulares y modelos de xenoinjerto y para las eluciones específicas durante la selección de fagos. Las secuencias variables publicadas de cadena pesada y ligera del mAb de Dll4 se clonaron en un armazón hIgG2ak, expresado de manera transitoria en células HEK293 y se purificó de sobrenadantes usando cromatografía de proteína A. Los mAb de Dll4 purificados demostraron unirse a Dll4 de ser humano y Dll4 de ratón en ELISA y FACS (usando células CHO-mDll4 y CHO-hDll4), afinidades subnanomolares para ambos ortólogos del factor de crecimiento en Biacore.

El fragmento Fab de Dll4 correspondiente se construyó mediante ensamblaje génico basándose en la retro traducción y optimización de codón para la expresión en *E. coli* usando el programa informático de optimización génica de Leto (www.entechelon.com). Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos para el ensamblaje de la cadena ligera variable (V_L), cadena pesada variable (V_H), cadena ligera constante (C_L) y dominio constante 1 de la cadena pesada (C_{H1}) y se realizó una PCR de ensamblaje. Los segmentos de ADNc que codificaban V_L+C_L y V_H+C_{H1} se clonaron en un vector derivado - pUC119, que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia a kanamicina, un sitio de clonación múltiple y una secuencia líder híbrida gIII-pelB, usando los sitios de restricción *SfiI* y *AscI* y los sitios de restricción *KpnI* y *NotI* respectivamente. En fase de lectura con la secuencia codificante para Fab, el vector de expresión codifica una HA C-terminal y una marca His6. El

220 219

fragmento Fab se expresó en *E. coli* como proteína marcada con His6 y posteriormente se purificó del medio de cultivo por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se representan las secuencias de aminoácidos relevantes de la cadena pesada variable y ligera variable (SEC ID Nº: 1 y SEC ID Nº: 2, respectivamente del documento US 2008/0014196); las secuencias de aminoácidos de la cadena completa pesada y ligera se muestra en las SEC ID Nºs:419 y 420, respectivamente.

c) Generación de mutantes de Dll4 para mapeo epitópico

Para identificar la región en el dominio extracelular (ECD) de Dll4 que comprende el epítopo reconocido por los VHH anti-Dll4, se generaron mutantes de delección progresiva del ECD de Dll4. Se generó el vector de expresión mamífero pSecTag2/Hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que comprende un promotor de CMV aguas arriba de los polinucleótidos que codifican una serie anidada de fragmentos de delección del ECD de Dll4 fusionado a una marca poliHis usando tecnología de ADN recombinante convencional (véase la Figura 2; delimitaciones de los dominios de aminoácidos en superíndice). Estas proteínas recombinantes se expresan en células HEK293 transfectadas de manera transitoria usando el Sistema de Expresión Freestyle 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de cuyo medio acondicionado se recogen y purifican mediante IMAC. Únicamente los mutantes de Dll4 que carecían del dominio de tipo EGF2 mostraron unión afectada con el mAb anti-Dll4 humanizado de reactividad cruzada de ser humano/ratón descrito anteriormente (inmovilizado mediante una placa detectora Biacore de captura recubierta con anti-IgG humana). Se sabe que esta IgG tiene un epítopo de unión específico en este dominio Dll4 (solicitud de patente Genentech, US 2008/0014196A1).

d) Generación plásmidos de ensayo indicador de Dll4

Se desarrolló un ensayo indicador basándose en la escisión mediada por γ-secretasa de Notch1 y traslocación nuclear del dominio intracelular de Notch1 (NICD) después de la estimulación con Dll4, esencialmente como se describe (Struhl y Adachi, Cell. 15 de mayo de 1998; 93(4):649-60). Se insertaron secuencias codificantes Gal4/VP16 en la secuencia codificante NICD. El potente activador transcripcional híbrido Gal4/VP16, que comprende un fragmento de unión al ADN de Gal4 de levadura fusionado con un dominio activador transcripcional viral del herpes simple VP16, se insertó en el extremo carboxilo del dominio

transmenbrana de Notch1. La escisión de esta construcción por γ-secretasa dio como resultado la liberación de la proteína de fusión Gal4/VP16 NICD que se translocará en el núcleo donde se unirá y activará transcripcionalmente un plásmido indicador de luciferasa cotransfectado, que contiene una fuerte secuencia promotora Gal4/UAS (Struhl, G. and Adachi, A., Cell, vol. 93, 649-660, 1998). El casete de expresión Notch1-Gal4/VP16 humano se clonó en pcDNA3.1(+)-neo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se usó el vector pGL4.31[Luc2P/Gal4UAS/Hygro] (Promega, Madison, WI, USA) como plásmido indicador de luciferasa.

e) Producción y ensayo de funcionalidad de VEGF109

Se clonó un ADNc que codifica el dominio de unión al receptor de la isoforma del factor de crecimiento endotelial vascular humano VEGF165 (GenBank: AAM03108.1; restos AA 27 - 135) en el vector pET28a (Novagen, Madison, WI) y se sobreexpresó en *E coli* (BL21 Star DE3) como una proteína insoluble marcada con His. La expresión se indujo por adición de IPTG 1 mM y se dejó continuar durante 4 horas a 37ºC. Las células se recuperaron por centrifugación y se lisaron exponiendo a ultrasonidos el sedimento celular. Los cuerpos de inclusión se aislaron por centrifugación. Después de la etapa de lavado con Tritón X100 al 1% (Sigma-Aldrich), las proteínas se solubilizaron usando hidroclururo de guanidina 7,5 M y se replegaron por rondas consecutivas de diálisis durante una noche usando tampones disminuyendo concentraciones de urea de 6 M hasta 0 M. La proteína replegada se purificó por cromatografía de intercambio iónico usando una columna MonoQ5/50GL (Amersham BioSciences) seguido por filtración en gel con una columna Superdex75 10/300 GL (Amersheim BioSciences). La pureza y homogeneicidad de la proteína se confirmó por SDS-PAGE y transferencia de Western. Además, mediante ELISA se controló la actividad de unión a VEGFR1, VEGFR2 y Bevacizumab. Con este fin, 1 µg/ml de VEGF109 humano recombinante se inmovilizó durante una noche a 4ºC en una placa MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1%). Se añadieron diluciones en serie de VEGFR1, VEGFR2 o Bevacizumab a la placa recubierta con VEGF109 y la unión se detectó usando una IgG de cabra anti-humana conjugada con fosfatasa alcalina (AP), específica de Fc (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato PNPP (p-nitrofenilfosfato) (Sigma-Aldrich). VEGF109 podía unirse a VEGFR1, VEGFR2 y Bevacizumab, indicando que el

22 AZ

VEGF109 es activo.

f) Conjugación de VEGF165 con KLH y ensayo de funcionalidad de VEGF165 conjugado con KLH

Se conjugó VEGF165 humano recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) con hemocianina de lapa californiana de cultivo marino (mcKLH) usando el kit Imject Immunogen EDC con mcKLH (Pierce, Rockford, IL, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La conjugación eficaz del polipéptido con mcKLH se confirmó por SDS-PAGE. La funcionalidad de la proteína conjugada se controló por ELISA: se inmovilizaron 2 μg/ml de VEGF165 conjugado con KLH durante una noche a 4ºC en una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1%). Se añadieron diluciones en serie de VEGFR1 o VEGFR2 y la unión se detectó usando una IgG de cabra anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP), específica de Fc (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (Pierce, Rockford, IL, USA). La proteína conjugada con KLH podía aun interaccionar con VEGFR1, VEGFR2 y Bevacizumab, confirmando que los epítopos relevantes en VEGF165 aún eran accesibles.

Ejemplo 1

La inmunización con Dll4 de especies diferentes induce una respuesta inmune humoral en llama

1.1 Inmunizaciones

Después de la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria (Universidad de Ghent, Bélgica), se inmunizaron 4 llamas (denominadas Nº. 208, 209, 230, 231) con 6 inyecciones intramusculares (100 ó 50 μg/dosis a intervalos semanales) de Dll4 humano recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, US). El antígeno Dll4 se formuló en Stimune (Cedi Diagnostics BV, Lelystad, Países Bajos). Se inmunizaron tres llamas más (denominadas Nº. 127b, 260, 261) de acuerdo con protocolos convencionales con 4 inyecciones subcutáneas de células CHO que sobreexpresan de manera alternativa Dll4 de ser humano y Dll4 de ratón que se establecieron como se ha descrito anteriormente. Las células se re-suspendieron en D-BPS y se conservaron en hielo antes de la inyección. Adicionalmente, se inmunizaron tres llamas más (denominadas Nº. 282, 283, 284) de acuerdo con protocolos convencionales con 4 inyecciones intramusculares (100

223

o 50 μg/dosis a intervalos quincenales) alternativas de Dll4 de ser humano y Dll4 de ratón recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, US). La primera inyección el día 0 con Dll4 de ser humano se formuló en adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI, USA) mientras que las inyecciones posteriores con Dll4 de ser humano y ratón se formularon en adyuvante incompleto de Freund (Difco, Detroit, MI, USA).

1.2. Evaluación de respuestas inmunes inducidas en llamas

Para evaluar la inducción de una respuesta inmune en los animales contra Dll4 de ser humano por ELISA, se extrajo suero de las llamas 208, 209, 230 y 231 el día 0 (pre-inmunización), el día 21 y el día 43 (tiempo de recogida de linfocitos de sangre periférica [PBL]), de las llamas 127b, 260 y 261 el día 0 y el día 51 y de las llamas 282, 283 y 284 el día 0, el día 28 y el día 50. En resumen, se inmovilizaron 2 μg/ml de Dll4 recombinante de ser humano o de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) durante una noche a 4ºC en una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1%). Después de la adición de diluciones en serie, las inmunoglobulinas específicamente unidas se detectaron usando una inmunoglobulina de cabra anti-llama conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (Pierce, Rockford, IL, USA), demostrando que se induce una respuesta inmune significativa dependiente de anticuerpos contra Dll4. La respuesta de anticuerpos se generó por repertorios de células B que expresaban el anticuerpo convencional y solo el de cadena pesada ya que las inmunoglobulinas que se unen específicamente pueden detectarse con anticuerpos que reconocen específicamente los anticuerpos IgG1 de llama convencionales o los anticuerpos IgG2 o IgG3 de llama solo de cadena pesada (Tabla 2-A). En todas las llamas a las que se inyectó Dll4 de ratón se generó una respuesta de anticuerpos por células B que expresaban el anticuerpo convencional y sólo el de cadena pesada específicamente contra Dll4 de ratón. Adicionalmente, se confirmaron titulaciones en suero de las células de los animales inmunizados por análisis FACS en células HEK293 que sobreexpresaban Dll4 de ser humano y de ratón (Tabla 2-B). En la Tabla 2 se representan las respuestas de las titulaciones en suero de Dll4 para cada llama.

224

Tabla 2: Respuesta sero específica contra Dll4 mediada por anticuerpos

A) ELISA (proteína recombinante, recubierta en fase sólida)

		Dll4 humano recombinante				**Dll4 de ratón recombinante**			
Llama	**Inmunógeno**	**IgG Total**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**	**IgG Total**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**
208	Dll4 humano recombinante	+	+	+/-	+/-	n/d	n/d	n/d	n/d
209	Dll4 humano recombinante	+	+	+/-	+/-	n/d	n/d	n/d	n/d
230	Dll4 humano recombinante	++	++	+/-	+/-	n/d	n/d	n/d	n/d
231	Dll4 humano recombinante	++	++	++	++	n/d	n/d	n/d	n/d
127b	CHO-hDll4 + CHO-mDll4	++	++	+/-	+/-	+	++	+/-	+/-
260	CHO-hDll4 + CHO-mDll4	++	++	+	+	++	++	+	++
261	CHO-hDll4 + CHO-mDll4	++	++	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
282	Dll4 humano recombinante +Dll4 de ratón	++	++	++	++	++	++	+	+
283	Dll4 humano recombinante +Dll4 de ratón	++	++	++	++	++	++	++	++
284	Dll4 humano recombinante +Dll4 de ratón	+	+	+	+	+	++	+	++

n/d, no determinado

225

B) FACS (proteína expresada de manera nativa en células HEK293)

		Dll4 humano				**Dll4 de ratón**			
Llama	**Immunógeno**	**IgG Total**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**	**IgG Total**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**
208	Dll4 humano recombinante	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
209	Dll4 humano recombinante	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
230	Dll4 humano recombinante	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
231	Dll4 humano recombinante	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
127b	CHO-hDll4 + CHO-mDll4	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
260	CHO-hDll4 + CHO-mDll4	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
261	CHO-hDll4 + CHO-mDll4	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
282	Dll4 humano recombinante +Dll4 de ratón	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
283	Dll4 humano recombinante +Dll4 de ratón	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
284	Dll4 humano recombinante +Dll4 de ratón	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

n/d, no determinado

Ejemplo 2

Clonación de repertorios de fragmentos de anticuerpos sólo de cadena pesada y preparación de fagos

Después de la inyección final con el inmunógeno, se extrajeron tejidos

226 225

inmunes como fuente de células B que producen los anticuerpos de cadena pesada de las llamas inmunizadas. Se extrajeron típicamente, dos muestras de sangre de 150 ml, a los 4 y 8 días después de la última inyección del antígeno y de cada animal se extrajo una biopsia de ganglio linfático, 4 días después de la última inyección con el antígeno. A partir de las muestras de sangre, se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando Ficoll-Hypaque de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). De las PBMC y de la biopsia de ganglio linfático, se extrajo ARN total, que se usó como material de partida para RT-PCR para amplificar los segmentos de ADN que codifican VHH, como se describe en el documento WO 05/044858. Para cada llama inmunizada se construyó una genoteca agrupando el ARN total aislado procedente de todos los tejidos inmunes extraidos de los animales. En resumen, el repertorio de VHH amplificado por PCR se clonó mediante sitios de restricción específicos en un vector diseñado para facilitar la presentación de fagos de la genoteca de VHH. El vector deriva de pUC119 y contiene el promotor LacZ, una secuencia que codifica la proteína gIII del fago M13, un gen de resistencia a ampicelina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple y una secuencia líder gIII-pelB hibrida (pAX050). En fase de lectura con la secuencia codificante de VHH, el vector codifica una marca c-myc en C-terminal y una marca His6. El fago se preparó de acuerdo con protocolos convencionales y se almacenó después de esterilización por filtración a 4ºC para su uso posterior.

Ejemplo 3

Selección de VHH específicos de Dll4 mediante presentación de fagos

Los repertorios VHH obtenidos de todas las llamas y clonados como fagotecas se usaron en diferentes estrategias de selección, aplicando una multiplicidad de estados de selección. Las variables incluyeron: i) el formato de proteína Dll4 (dominio extracelular expresado de manera recombinante marcado con His en el extremo C de Dll4 de ser humano (Met1-Pro524) y Dll4 de ratón (Met1-Pro525) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) o Dll4 de ser humano y Dll4 de ratón de longitud completa presentes en células CHO o HEK293 que sobreexpresan Dll4, ii) el método de presentación de antígenos (placas directamente revestidas con Dll4 o placas revestidas con Neutravidina con Dll4 mediante una marca de biotina; fase de solución: incubación en solución seguido de captura sobre las placas revestidas con Neutravidina), iii) la concentración de antígeno y iv) métodos de elución diferentes (mediante tripsina no específica o mediante

227 226

quimera de Notch1/Fc del receptor afín o IgG/Fab anti-Dll4). Todas las selecciones se realizaron en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania).

Las selecciones se realizaron de la siguiente manera: las preparaciones de antígeno Dll4 para formatos de selección en fase sólida y en solución se presentaron como se ha descrito anteriormente a concentraciones múltiples. Después de 2 h de incubación con las fagotecas seguido de extenso lavado, los fagos unidos se eluyeron con tripsina (1 mg/ml) durante 30 minutos. En caso de usar tripsina para la elución de los fagos, la actividad proteasa se neutraliza inmediatamente aplicando inhibidor de proteasa ABSF 0,8 mM. Como control, se realizaron selecciones sin antígeno en paralelo. Los fagos producidos que muestran enriquecimiento sobre el fondo (control sin antígeno) se usaron para infectar *E. coli*. Las células de *E. coli* infectadas se usaron para preparar fagos para la siguiente ronda de selección (rescate de fagos) o se sembraron en placas con agar (LB-amp+glucosa$^{2\%}$) para análisis de clones VHH individuales. Para explorar una producción de selección para aglutinantes específicos, se tomaron colonias individuales procedentes de las placas de agar y se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos de 1 ml. La expresión de VHH controlada por LacZ se indujo añadiendo IPTG (0,1- 1 mM final) en ausencia de glucosa. Se prepararon extractos periplásmicos (en un volumen de ~ 80 ul) de acuerdo con protocolos convencionales.

Ejemplo 4

Exploración de extractos periplásmicos en ensayos de competencia AlphaScreen y FMAT para Dll4-Notch1

Se exploraron extractos periplásmicos en un ensayo AlphaScreen Dll4/humano Notch1 para evaluar la capacidad bloqueante de los VHH expresados. Se biotiniló Dll4 humano usando biotina (Sigma, St Louis, MO, USA) y sal de sodio del éster 3-sulfo-N-hidroxisuccinimida del ácido biotinamidohexanoico (Sigma, St Louis, MO, USA). La quimera Notch1/Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) se capturó usando un VHH anti-Fc que se acopló a perlas aceptoras de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Para evaluar la capacidad neutralizante de los VHH, se pre-incubaron diluciones en serie de los extractos periplásmicos con Dll4 humano biotinilado. A esta mezcla, se añadieron las perlas aceptoras y las perlas donantes de estreptavidina y se incubaron después durante 1 hora a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió por

228

placas de lectura en el lector Envision Multilabel Plate (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) usando una longitud de onda de excitación de 680 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La disminución de la señal de fluorescencia indica que el VHH expresado en el extracto periplásmico bloquea la unión del Dll4 humano biotinilado al receptor Notch1/Fc humano.

De manera alternativa, se usaron células CHO-hDll4 y CHO-mDll4 en un ensayo de competencia FMAT (Tecnología de Ensayo Fluorimétrico en Microvolumen) para Notch1/Fc humano. La quimera Notch1/Fc humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) se marcó aleatoriamente con Alexa-647 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). En breve, se añadieron 5 µl de material periplásmico a Notch1/Fc humano marcado 100 pM o 175 pM junto con 7500 células que sobreexpresaban CHO-hDll4 o CHO mDll4, respectivamente, y la lectura se realizó después de 2 horas de incubación. Para establecer la línea basal sin competencia, se incluyeron al menos 30 replicados de células con Notch1/Fc humano ~ Alexa647 y el porcentaje de inhibición se calculó a partir esta línea basal. Todos los cálculos se basaron en la señal total_FL1 que comprende la media de la fluorescencia por tiempos de pocillo del número de recuentos por pocillo.

Para esta exploración, se seleccionaron y se secuenciaron los VHH inhibidores. El análisis de secuencia reveló 166 VHH únicos pertenecientes a 40 linajes de células B diferentes. En la Tabla 3 se representa el número total de variantes encontrado paca cada linaje de células B. En la Tabla 4 se proporciona una visión general de los datos de exploración periplásmicos. Las secuencias de aminoácidos de los VHH únicos seleccionadas para caracterización posterior se muestran en la Lista de Secuencias (SEC ID N^{os}: 4-20) y en la Tabla 5 (se indican las CDR y las regiones flanqueantes).

Tabla 3: Parámetros de selección usados para la identificación de los linajes de células B de VHH específicos de Dll4

Linaje de células B	VHH ID	Nº variantes	Genoteca	Formato de selección	Elución de fagos	Rondas de selección
1	DLLBII8A09	31	231	rhDll4 (3 nM)	tripsina	1
2	DLLBII5B11	1	231	rhDll4 (3 nM)	tripsina	1
3	DLLBII7B05	21	231	RI: biot-rhDll4 (3 nM) RII: biot-rhDll4 (0,03 nM)	tripsina	2
4	DLLBII6B11	13	231	biot-rhDll4 (3 M)	tripsina	1

229 27-8

5	DLLBII8C11	5	231	RI: biot-rhDII4 (3 nM) RII: biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	2
6	DLLBII19D10	1	231	biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	1
7	DLLBII33C05	2	231	CHO-hDII4 (2E6/ml)	tripsina	1
8	DLLBII28B06	2	231	rmDII4 (0.5 μg/ml)	tripsina	1
9	DLLBII17G10	1	231	biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	1
10	DLLBII17C01	8	231	biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	1
11	DLLBII19F04	1	231	biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	1
12	DLLBII17F10	1	231	biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	1
13	DLLBII17B03	5	231	biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	1
14	DLLBII19F12	2	231	biot-rhDII4 (3 nM)	tripsina	1
15	DLLBII42B07	1	231	RI: biot-rhDII4 (3 nM) RII: biot-rhDII4 (3 nM)	rhNotch1/Fc	2
16	DLLBII47D01	1	230	RI: biot-rhDII4 (3 nM) RII: biot-rhDII4 (3 nM)	rhNotch1/Fc	2
17	DLLBII56A09	15	230	RI: CHO-mDII4 (2E6/ml) RII: CHO-mDII4 (2E6/ml)	rhNotch1/Fc	2
18	DLLBII95F02	5	230	RI: CHO-mDII4 (2E6/ml) RII: CHO-mDII4 (2E6/ml)	tripsina	2
19	DLLBII96C03	20	230	RI: CHO-mDII4 (2E6/ml) RII: CHO-mDII4 (2E6/ml)	tripsina	2
20	DLLBII104G01	1	230	RI: CHO-mDII4 (2E6/ml) RII: CHO-mDII4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDII4 (+rhDII4)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
21	DLLBII102F08	3	230	RI: CHO-mDII4 (2E6/ml) RII: CHO-mDII4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDII4 (0,01 nM)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
22	DLLBII112A03	1	209	RI: CHO-mDII4 (2E6/ml) RII: CHO-mDII4 (2E6/ml)	tripsina	2
23	DLLBII102G04	2	230	RI: CHO-mDII4 (2E6/ml) RII: CHO-mDII4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDII4 (0,01 nM)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3

230 AC

24	DLLBII101G08	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (0,1 nM)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
25	DLLBII112A04	1	209	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml)	tripsina	2
26	DLLBII101H09	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (0.1 nM)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
27	DLLBII101H05	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (1 nM)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
28	DLLBII112E07	1	209	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml)	tripsina	2
29	DLLBII101F01	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (1 nM)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
30	DLLBII104A03	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (1 nM) + rhDll4	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
31	DLLBII104C04	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (1 nM) + rhDll4	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
32	DLLBII104B05	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (1 nM) + rhDll4	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII)	3
33	DLLBII107C03	1	208	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml)	rhNotch1/Fc	2
34	DLLBII58A11	4	260	RI: biot-rhDll4 (3 nM) RII: biot-rmDll4 (3 nM)	rhNotch1/Fc	2
35	DLLBII61F05	1	260	RI: HEK293H-hDLL4 (2E6/ml) RII: HEK293H-hDLL4 (2E6/ml)	tripsina	2

231 230

36	DLLBII61F07	1	260	RI: HEK293H-hDLL4 (2E6/ml) RII: HEK293H-hDLL4 (2E6/ml)	tripsina	2
37	DLLBII62C11	1	260	RI: HEK293H-hD4 (2E6/ml) RII: HEK293H-mDll4 (2E6/ml)	tripsina	2
38	DLLBII115A05	1	230	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RII: CHO-mDll4 (2E6/ml) RIII: biot-rhDll4 (1nM) RIV:CHO-mDll4 (2E6/ml)	rhNotch1/Fc (RI-RII) tripsina (RIII) tripsina (RIV)	4
39	DLLBII83G01	4	284	RI: CHO-mDll4 (2E6/ml) RI: CHO-hDll4 (2E6/ml)	Dll4 IgG	2
40	DLLBII80E08	1	283	RI: CHO-hDll4 (2E6/ml) RI: CHO-hDll4 (2E6/ml)	Dll4 IgG	2

Tabla 4:

Exploración de extractos periplásmicos que contienen VHH anti-Dll4 expresados

Linaje de células B	VHH ID Representativo	**Nº de secuencias únicas**	**ELISA**	**Alpha Screen**	**FMAT**	**FMAT**	**Biacore (a)**
			HDLll4 % inh	hDLll4 % inh	hDll4 % inh	mDll4 % inh	k_d (s^{-1})
1	DLLBII8A09	31	96	-	-	-	$(1,2^{E-03}$ - $2,4^{E-04})$
2	DLLBII5B11	1	98	-	-	-	-
3	DLLBII7B05	21	84	-	-	-	$(2,4^{E-04})$
4	DLLBII6B11	13	98	-	-	-	$(9,4^{E-04}$ - $3,7^{E-04})$
5	DLLBII8C11	5	57	-	-	-	$(7,3^{E-04}$ - $6,0^{E-04})$
6	DLLBII19D10	1	98	85	-	-	$1,3^{E-03}$
7	DLLBII33C05	2	86	75	-	-	$9,2^{E-04}$ $(2,1^{E-03})$
8	DLLBII28B06	2	23	54	-	-	$7,5^{E-03}$ $(1,6^{E-04})$
9	DLLBII17G10	1	93	82	-	-	$1,5^{E-03}$
10	DLLBII17C01	8	82	84	-	-	$5,6^{E-04}$ $(5,6^{E-04}$ - $5,3^{E-04})$
11	DLLBII19F04	1	98	95	-	-	$1,1^{E-03}$
12	DLLBII17F10	1	98	88	-	-	$1,1^{E-03}$ / $3,1^{E-04\ (b)}$
13	DLLBII17B03	5	76	77	-	-	$1,2^{E-03}$ / $2,2^{E-04\ (b)}$
14	DLLBII19F12	2	98	98	-	-	$4,9^{E-04}$ $(1,0^{E-03})$
15	DLLBII42B07	1	-	-	-	-	-

232 234

16	DLLBII47D01	1	-	-	87	-	-
17	DLLBII56A09	15	-	-	-	-	$1,1^{E-03}$ ($9,5^{E-03}$-$1,1^{E-03}$)
18	DLLBII95F02	5	-	-	81	71	$6,7^{E-04}$
19	DLLBII96C03	20	-	-	75	83	-
20	DLLBII104G01	1	-	-	94	86	$1,2^{E-03}$ ($1,4^{E-03}$-$9,4^{E-04}$)
21	DLLBII102F08	3	-	-	85	75	-
22	DLLBII112A03	1	-	-	72	97	-
23	DLLBII102G04	2	-	-	86	82	-
24	DLLBII101G08	1	-	-	91	92	$2,1^{E-03}$
25	DLLBII112A04	1	-	-	75	90	-
26	DLLBII101H09	1	-	-	87	75	-
27	DLLBII101H05	1	-	-	85	83	-
28	DLLBII112E07	1	-	-	80	85	-
29	DLLBII101F01	1	-	-	85	78	$2,0^{E-02}$
30	DLLBII104A03	1	-	-	86	83	-
31	DLLBII104C04	1	-	-	87	83	$1,0^{E-03}$
32	DLLBII104B05	1	-	-	86	78	-
33	DLLBII107C03	1	-	-	75	80	-
34	DLLBII58A11	4	-	-	95	73	$1,6^{E-03}$ ($1,7^{E-03}$-$1,6^{E-03}$)
35	DLLBII61F05	1	-	-	74	76	-
36	DLLBII61F07	1	-	-	79	77	-
37	DLLBII62C11	1	-	-	74	71	-
38	DLLBII115A05	1	-	-	74	84	$3,1^{E-03}$
39	DLLBII83G01	4	-	-	87	93	$4,1^{E-04}$
40	DLLBII80E08	1	-	-	71	82	-

[a] si se identifican variantes únicas múltiples dentro de un linaje de células B, el intervalo (max-min) en la disociación o la disociación de un miembro del linaje se proporciona entre paréntesis en cursiva).

[b] ajuste heterogéneo: disociación rápida y lenta determinada.

237 257

Tabla 5: Secuencias ID y secuencias AA de los VHH anti-Dll4 monovalentes seleccionados (FR, región flanqueante; CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID/ **SEC ID Nº**	**Región flanqueante 1**	**CDR 1**	**Región flanqueante 2**	**CDR 2**	**Región flanqueante 3**	**CDR 3**	**Región flanqueante 4**
DLLBII05B1 1 **4**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAIS GFTLD	LHVIG	WLRQAPGKEREW VS	CISSSDG STYYADS VKG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	PWDSWYCGIGN DYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII06B1 **5**	EVQLVESEGGLV QAGGSLRLSCAA SGSTFS	SYAMG	WYRQAPGKQREL VA	VISNGGIT NYPNSVK G	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCFY	SGSYYYPTDVH EYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 07A02 **6**	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGSTFN	SYAMG	WYRQAPGKQRE WVA	AFSTGGS TNYADSV KG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCFY	SGSYYYPTDVF EYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 07B05 **7**	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGFALD	YYAVG	WFRQAPGKEREG VS	CISSRGG STFYADS VKG	RFTTSRNNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAA	HPLQNCCGGSA YASPEAVYEY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 08A09 **8**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTLD	YYNIG	WFRQAPGKERE WVS	CINSSDG STYYADS VKG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	PFAYYSNLCGV NGYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 08C11 **9**	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEREG VS	CISSHDR TTYYADS VKG	RFTISSDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DPLVCGYNDPR LADY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 101G08 **10**	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGRTFS	SYAMA	WFRQAPGKEREF VA	AIRWSGG TAYYADS VQG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAN	RAADTRLGPYE YDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 104G01 **11**	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEREG VS	CISSSDG STYYADS VKG	RFTISSDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAT	AWCDSSWYRS FVGY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 115A05 **12**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFG	SYDMS	WVRRSPGKGPE WVS	SINSGGG STYYADF VKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DRYIRARQGDY WGAYEYDY	WGQGTQVTVSS

DLLBII 19F04 **13**	EVQLVESGGGLV QAEGSLRLSCAAS GSTFS	TYAMA	WYRQAPGKQREL VA	GISFDGS THYAESV KG	RFTISRDDAKNTVSLQM NSLKPEDAAVYYCYS	VHPSTGFGS	WGQGTQVTVSS
DLLBII 55D12 **14**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPEG IS	CISSSGGI TYYADSV KG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAT	PGIAACRGIHY	TGQGTQVTVSS
DLLBII 56A09 **15**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPEG IS	CISSSGGI TYYADSV KG	RFTTSRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAT	PGIAACRGIHY	TGQGTQVTVSS
DLLBII 56C04 **16**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCTA SGFTFD	VYAIG	WFRQAPGKEPEG IS	CISSSGSI TYYADSV KG	RFTTSRDSAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAT	PGIAACRGIHY	WGQGTQVTVSS
DLLBII56H0 8 **17**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPEEI S	CISSSGGI TYYADSV KG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAT	PGIAACRGIHY	TGQGTQVTVSS
DLLBII 62C11 **18**	EVQLMESGGGLV QPGGSLRLSCVA AGFTFS	NYYMS	WVRQAPGKGLE WVS	VISPDGS NTYYADT VKG	RFTISRGNAKNTLFLQM TGLKSEDAAVYYCAR	GSGSWGV	HGQGTQVTVSS
DLLBII 96C03 **19**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFG	NYDMS	WVRQAPGKGPE WVS	AINSGGG DTYYADS VKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAT	PRGWGPTGPH EYGY	WGQGTQVTVSS
DLLBII 57C11 **20**	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCTA SGFTFD	DYAIG	WFRQAPGKEPEG IS	CISSSGSI TYDADSV KG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAT	PGIAACRGIHY	WGQGTQVTVSS

132
234

Ejemplo 5

Caracterización de los VHH anti-Dll4 purificados

Adicionalmente se purificaron y caracterizaron los VHH andi-Dll4 inhibidores seleccionados de la exploración descrita en el Ejemplo 4. Los VHH seleccionados se expresaron en TG1 de *E. coli* como proteínas c-myc, marcadas con His6. La expresión se indujo por adición de IPTG 1 mM y se dejó continuar durante 4 horas a 37°C. Después de centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplásmicos congelando-descongelando los sedimentos. Estos extractos se usaron como material de partida y los VHH se purificaron mediante IMAC y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), dando como resultando una pureza del 95% según se evalúa mediante SDS-PAGE.

5.1. Evaluación de los VHH que bloquean Dll4 en ELISA

La capacidad bloqueante de los VHH se evaluó en un ELISA de bloqueo Notch1/Fc humano para Dll4. En resumen, se revistieron 1 μg/ml de quimera Notch1/Fc humana (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) en una placa MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Una concentración fija de Dll4 humano biotinilado 15 nM se preincubó con una dilución en serie de VHH durante 1 hora, después de la cual la mezcla se incubó sobre el receptor de Notch1 revestido durante una hora más. La unión residual de Dll4 humano biotinilado se detectó usando peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con extravidina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Figura 3). El Dll4 humano se biotiniló como se ha descrito anteriormente. En la Tabla 6 se representan los valores CI_{50} para los VHH que bloquean la interacción de Dll4 humano- Notch1/Fc humano.

Tabla 6: Valores CI_{50} (nM) para los VHH en ELISA de competencia para hDLL4/hNotch1-Fc ELISA

VHH ID	**CI_{50} (nM)**
6B11	1,5
55D12	12,3
56A09	4,9
56C04	33,9
56H08	6,9
57C11	17,3
62C11	72,0
96C03	38,4
101G08	9,5
104G01	1,1
115A05	9,1
Fab antiDll4	0,7

5.2. Evaluación de los VHH que bloquean Dll4 en AlphaScreen

En resumen, se capturó Dll4 humano biotinilado 1 nM sobre perlas donantes revestidas con estreptavidina (20 μg/ml), mientras que 0,4 nM de Notch1 humano receptor (como una proteína de fusión Fc) se capturó sobre perlas aceptoras revestidas con VHH Fc anti-humano (20 μg/ml). Ambas perlas cargadas se incubaron junto con un intervalo de dilución del VHH de competencia (Figura 4). En la Tabla 7 se representan los valores CI_{50} para los VHH que bloquean la interacción Dll4 de ser humano - Notch1/Fc de ser humano.

Tabla 7: Valores CI_{50} (nM) para los VHH en AlphaScreen de competencia para hDLL4/hNotch1

VHH ID	**CI_{50} (nM)**
5B11	0,7
6B11	0,3
7A02	0,4
7B05	1,1
8A09	0,4
8C11	0,7 [(a)]
19F04	0,05 [(a)]
55D12	2,3
56A09	1,2
56C04	5,4
56H08	1,6
57C11	2,2
62C11	24,1
115A05	5,0
Fab antiDll4	0,3

[(a)] inhibidor parcial

5.3. Inhibición por los VHH anti-Dll4 de Notch1/Fc de ser humano unido a Dll4 de ser humano o ratón expresados sobre células CHO

La capacidad bloqueante de los VHH se evaluó en un ensayo FMAT competitivo para Dll4 de ser ratón - Notch1/Fc de ser humano (Figura 5) como se describe en el Ejemplo 4. En la Tabla 8 se representan los valores CI_{50} para los VHH que bloquean la interacción de Notch1/Fc de ser humano con respecto a Dll4 de ser humano o de ratón expresados en células CHO.

Tabla 8: Valores (media) CI_{50} (nM) de los VHH purificados que bloquean la interacción de Notch1/Fc de ser humano con respecto a Dll4 de ser humano o ratón expresados en células CHO (FMAT)

	hDll4	mDll4
VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**CI_{50} (nM)**
6B11	8,9	-
8A09	5,5	-
19F04	33,0	-
55D12	39,1	41,0
56A09	10,6	15,0
56C04	28,7	49,6
56H08	22,0	33,7
57C11	53,9	49,5
62C11	172,2	106,3
96C03	160,8	28,8
101G08	24,6	92,1
104G01	2,5	-
115A05	22,0	43,0
Fab antiDll4	5,4	2,3

5.4. Evaluación de los VHH que bloquean Dll4 en un ensayo indicador

Para evaluar la potencia de los VHH seleccionados, se estableció un ensayo indicador que se basó en la escisión de Notch1 mediada por γ-secretasa y la liberación del dominio intracelular de Notch1 (NICD) después de la estimulación con Dll4. La construcción Notch1-GAL4/VP16 se cotransfectó con el plasmido indicador pGL4.31 [Luc2P/Gal4UAS/Hygro] en células HEK dando como resultado una expresión transitoria de la proteína de fusión. Estas células transfectadas de manera transitoria se estimularon durante 24 horas mediante co-cultivo con una línea celular estable HEK293-hDll4. Cuarenta y ocho horas después de la post-transfección, se realizó la lectura. Los VHH se preincubaron con las células HEK293-hDll4 1 hora antes del inicio del co-cultivo y se incluyeron durante el co-cultivo (Figura 6). En la Tabla 9 se representan los valores CI_{50} de los VHH para bloquear la escisión de Notch1 mediada por Dll4 y posterior translocación de su NICD al núcleo de la célula receptora.

Tabla 9: Valores (media) CI_{50} (nM) de los VHH purificados en un ensayo indicador para Dll/Notch1

VHH ID	**CI_{50}**
56A09	540
62C11	4663
96C03	5156
101G08	2760
104G01	964
115A05	1740
Fab anti-Dll4	133

239

5.5. Unión al epítopo

Para determinar si los VHH pueden unirse de manera simultánea a Dll4 cuando, por ejemplo, un anticuerpo de punto de referencia está unido, se realizaron experimentos de unión a epítopo (mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) en un instrumento Biacore T100). El fragmento Fab anti-Dll4 se inmovilizó de manera irreversible sobre la referencia y sobre la célula de flujo activa de una placa detectora CM5. Para cada ejemplo (ciclo), se inyectó Dll4 de ser humano sobre la célula de flujo activa y de referencia y se capturó de manera reversible por un Fab anti-Dll4. La unión adicional de los VHH se evaluó por inyección sobre la superficie inmovilizada. Todos los VHH y los Fab anti-Dll4 se inyectaron a 100 nm con un tiempo de contacto superficial de 120 segundos y un caudal de 10 µl/minuto. La superficie se regeneró usando glicina 10 mM (pH 1,5). Las curvas procesadas se evaluaron con el programa informático de evaluación Biacore T100. La Tabla 10-A representa la ruta de inyección/regeneración secuencial de los VHH analizados y controles. Se demuestra que los VHH DLLBII56A09 (SEC ID Nº: 15), DLLBII96C03 (SEC ID Nº: 19), DLLBII101G08 (SEC ID Nº: 10) y DLLBII115A05 (SEC ID Nº: 112) no se unen adicionalmente al Dll4 humano capturado por Fab de Dll4. La inyección de Fab de Dll4 tampoco se unió adicionalmente a Dll4 de ser humano indicando que todos los epítopos estaban saturados.

Por lo tanto, puede llegarse a la conclusión de que estos VHH reconocen un epítopo solapante con Fab de Dll4 para la unión a Dll4 de ser humano. Sólo los VHH de ser humano DLLBII6B11 (SEC ID Nº: 5) y DLLBII104G01 (SEC ID Nº: 11) mostraron unión adicional sobre Fab de Dll4 capturado en Dll4 de ser humano, lo que indica que estos VHH son específicos de Dll4 de ser humano que reconocen un epítopo diferente distinto a los VHH de reacción cruzada humano/ratón.

Tabla 10-A: Unión al epítopo de los VHH anti-Dll4 – unión simultánea con Fab de Dll4

Etapa de Inyección	**Unión/** *Regeneración*	**[muestra]**	**Nivel de unión (RU)**
1	hDll4	100 nM	1727
2	Fab de Dll4	100 nM	sin unión
3	59A9	100 nM	sin unión
4	6B11	100 nM	405
5	*Glicina pH1,5*	10 mM	90
6	hDll4	100 nM	1349
7	104G1	100 nM	276
8	*Glicina pH1,5*	10 mM	87
9	hDll4	100 nM	1336
10	*Glicina pH1,5*	10 mM	70

240

11	hDll4	100 nM	1333
12	96C3	100 nM	sin unión
13	101G8	100 nM	sin unión
14	115A05	100 nM	sin unión
15	*Glicina pH,.5*	10 mM	70

5.6. Mapeo epitópico usando mutantes de deleción de Dll4

La unión de los VHH a estos mutantes Dll4 se ensayó en Biacore. En resumen, los VHH DLLBII101G08 (SEC ID Nº: 10) y DLLBII115A5 (SEC ID Nº: 12) se revistieron sobre una placa detectora CM4 y se inyectó 200 nM de cada mutante por deleción a través de la placa. La unión se evaluó de manera cualitativa. No se observó unión de DLLBII56A09 (SEC ID Nº: 15), DLLBII101G08 (SEC ID Nº: 10) y DLLBII115A05 (SEC ID Nº: 12) a los mutantes Dll4 de ser humano y ratón hDll4.1 y mDll4.8, respectivamente, que carecen de dominio de tipo EGF-2 (Tabla 10-B). La prueba indirecta usando un ELISA de competencia IgG hDll4/Dll4 ya señalaba esta observación. En resumen, 1 μg/m de IgG de Dll4 se aplicó como recubrimiento en una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Una concentración fija de Dll4 humano biotinilado 6 nM se preincubó con una dilución en serie del VHH durante 1 hora, después de lo cual la mezcla se incubó en la IgG revestida durante una hora más. La unión residual del Dll4 humano biotinilado se detectó usando peroxidasa de rábano picante conjugada con extravidina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (datos no mostrados). El Dll4 humano se biotiniló como se ha descrito anteriormente. Se sabe a partir de bibliografía de patente que la IgG anti-Dll4 monoclonal (Genentech, US 2008/0014196A1) se une a un epítopo dentro del dominio de tipo EGF-2 de Dll4.

Tabla 10-B: Mapeo epitópico de los VHH anti-Dll4 de unión a mutantes de deleción Dll4.

	DLLBII56A9		**DLLBII101G8**		**DLLBII115A5**	
Muestra	**Unión (RU)**	**kd (1/s)**	**Unión (RU)**	**Kd (1/s)**	**Unión (RU)**	**kd (1/s)**
hDll4	281	9,5E-04	373	2,0E-03	324	3,5E-03
mDll4	389	1,9E-03	502	6,0E-03	344	6,5E-03
hDll4.1	sin unión		sin unión		sin unión	
hDll4.3	125	7,4E-04	198	4,65E-03	137	3,5E-03
hDll4.5	143	1,2E-03	266	2,19E-03	162	4,2E-03
hDll4.6	136	1,1E-03	229	2,20E-03	152	4,1E-03
mDll4.8	sin unión		sin unión		sin unión	
mDll4.10	141	1,1E-03	189	5,14E-03	121	3,8E-03

mDll4.11	132	1,6E-03	210	6,16E-03	121	6,6E-03
mDll4.12	161	1,3E-03	244	4,52E-03	152	3,1E-03

5.7. Determinación de la afinidad de la interacción hDll4 - VHH

Se realizó un análisis cinético para determinar la afinidad de la interacción de Dll4 - VHH mediante resonancia por Plasmon superficial (SPR) en un instrumento Biacore T100. El Dll4 humano recombinante se inmovilizó sobre una placa CM5 mediante acoplamiento con amina usando EDC y NHS) o Dll4 humano biotinilado se capturó sobre una placa SA (superficie con estreptavidina). Los VHH o fragmento Fab purificados se inyectaron durante 2 minutos a concentraciones diferentes (entre 10 y 300 nM) y se dejó disociarse durante 20 minutos a un caudal de 45 µl/min. Entre las inyecciones de las muestras, las superficies se regeneraron con glicina 10 mM pH 1,5 y HCl 100 mM. Se usó HBS-N (tampón Hepes pH 7,4) como tampón de desarrollo. Si es posible, los datos se evaluaron ajustando un modelo de interacción 1:1 (unión Langmuir) sobre las curvas de unión. La constante de afinidad K_D se calculó a partir de las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_a) y (k_d). En la Tabla 11 se muestran las afinidades de los VHH anti-Dll4.

Tabla 11: Afinidad K_D (nM) de los VHH purificados para el Dll4 humano recombinante

	rhDll4		
VHH ID	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**
56A09	1,7E+05	9,3E-04	5,6
56C04	1,1E+05	4,9E-03	45
56H08	1,2E+05	1,1E-03	9,4
62C11	1,2E+06	1,3E-01	120
96C03	1,6E+05	4,8E-02	310
101G08	4,3E+04	2,2E-03	52
104G01 [(a)]	1,2E+05 - 1,5E+05	3E-03 – 6E-04	4-24
115A05	1,5E+05	3,9E-03	25
Fab antiDll4	2,3E+05	3,4E-04	1,5

([a]) curva de unión heterogénea resultante en un ajuste nº 1:1

5.8. Unión a ortólogos (mDll4, cDll4) y a miembros de la familia (hJagged-1, hDll1)

Para determinar la reactividad cruzada a Dll4 de ratón se realizó un ELISA de unión. En resumen, Dll4 de ratón recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) se revistió durante una noche a 4ºC a 1 µg/ml en una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con

una solución de caseína (1% en PBS). Los VHH se aplicaron como diluciones en serie y la unión se detectó usando anti-myc de ratón (Roche) y un conjugado anti-AP de ratón (Sigma, St Louis, MO, USA) (Figura 7). Como referencia, se midió la unión a Dll4 de ser humano. Los valores CE_{50} se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12: Valores EC_{50} (nM) para los VHHs en un ELISA de unión de Dll4 humano y Dll4 de ratón recombinantes.

	rhDll4	**rmDll4**
VHH ID	**CE_{50} (nM)**	**CE_{50} (nM)**
5B11	1,8	-
6B11	1,4	-
7A02	1,4	-
7B05	7,2	-
8A09	0,9	-
8C11	1,1	-
17F10	0,9	-
19F04	0,9	0,8
55D12	13,1	30,0
56A09	3,6	6,3
56C04	44,3	244,0
56H08	4,1	8,7
57C11	7,9	83,4
62C11	137,0	13,1
96C03	86,5	8,7
101G08	8,9	53,9
104G01	8,4	-
115A05	5,0	33,4
Fab antiDll4	3,0	3,0

Para determinar la reactividad cruzada de los VHH de cinomolgo, se realizó un experimento de unión FACS. Se usaron células HEK293 (transfección transitoria o estable) que expresaban Dll4 de mono cinomolgo para un experimento de unión de titulación de los VHH. Después de 30 minutos de incubación en hielo, todas las muestras se lavaron y se realizó la detección aplicando anti-c-myc ~ Alexa647 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Como referencia, se tomaron células HEK293 que sobreexpresaban Dll4 de ser humano y de ratón. El valor medio MCF se determinó sobre la matriz FACS y se usó para calcular el valor CE_{50} (véase la Figura 9).

La ausencia de unión a ligandos homólogos Dll1 de ser humano y Jagged-1 de ser humano se evaluó mediante un ensayo de unión en fase sólida (ELISA). En resumen, Dll1 de ser humano (Alexis, San Diego, CA, USA) y Jagged-1 de ser humano (Alexis, San Diego, CA, USA) se revistieron durante una noche a 4ºC a 1 µg/m en una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los

pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1% en PBS). Los VHH se aplicaron como diluciones en serie y la unión se detectó usando un anti-myc de ratón (Roche) y un conjugado anti-AP-ratón (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se consideró que ningún VHH anti-Dll4 mostraba reactividad cruzada con estos ligandos homólogos (Figura 8).

5.9. Evaluación de los VHH anti-Dll4 bloqueando la proliferación HUVEC mediada por Dll4

Se evaluó la potencia de los VHH seleccionados en un ensayo de proliferación como describen Ridgway *et al.*, Nature. 21 de diciembre del 2006; 444 (7122):1083-7), en forma modificada. En resumen, se revistieron placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con Dll4-His purificado (RnD Systems; Dll4 de ser humano marcado con His en el extremo C, aminoácidos 27-524, 0,75 ml/pocillo, 10 ng/ml) en tampón de recubrimiento (PBS, 0,1% BSA). Los pocillos se lavaron en PBS antes de sembrar 4000 células HUVEC/pocillo por cuadruplicado. La proliferación celular se midió incorporando [^{3}H]-timidina el día 4. Los resultados, mostrados en la Figura 15, demuestran que los VHH de Dll4 DLLBII101G08, DLLBII104G01, DLLBII115A05, DLLBII56A09 y el Fab de Dll4 inhiben el efecto dependiente de Dll4 sobre la proliferación de HUVEC de una manera dependiente de la dosis, los valores CI_{50} se resumen en la Tabla 13. Los VHH ensayados consiguen la inhibición completa del efecto dependiente de Dll4 a 10 μM.

Tabla 13: Valores CI_{50} obtenidos en el ensayo de proliferación Dll4

VHH/ Fab	**Fab**	**56A9**	**104G1**	**101G8**	**115A5**
CI_{50} (nM) (experimento 1)	4,9	11,0	103	401	10002
CI_{50} (nM) (experimento 2)	5,6	6,8	32	112	N,D,
N	2	2	2	2	1

Ejemplo 6

Maduración por afinidad de los VHH anti-Dll4 seleccionados

Los VHH DLLBII101G08 y DLLBII115A05 se sometieron a dos ciclos de maduración por afinidad.

En un primer ciclo, se introdujeron sustituciones de aminoácidos aleatoriamente tanto en el armazón (FW) como en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) usando el método PCR propenso a error. La mutagénesis se realizó en una estrategia basada en PCR de doble ronda (kit de mutagénesis aleatoria Genemorph II obtenido de Stratagene, La Jolla, CA, USA)

usando 1 ng del molde de ADNc de DLLBII101G08 o DLLBII115A05, seguido por una segunda PCR propensa a error usando 0,1 ng del producto de la ronda 1. Después de una etapa de pulido, los productos de la PCR se insertaron mediante sitios de restricción únicos en un vector diseñado para facilitar la presentación de fagos de la genoteca de VHH. Se realizaron rondas consecutivas de selecciones en solución usando concentraciones en disminución de Dll4 humano recombinante biotinilado (biot-rhDll4) y eluciones con tripsina. También se realizaron selecciones conducidas por afinidad en una tercera ronda usando rhDll4 frío (al menos 100x de exceso sobre biot-rhDll4). No se incluyeron selecciones sobre Dll4 murino (conservación) ya que la reactividad cruzada se evalúa al nivel de exploración. Los mutantes individuales se produjeron como proteínas recombinantes usando un vector de expresión derivado de pUC119, que contiene el promotor LacZ, un gen de resistencia a ampicilina, un sitio de clonación múltiple y una secuencia líder ompA (pAX50). Células TG1 de *E. coli* se transformaron con la genoteca del vector de expresión y se sembraron en placas de agar (LB + Amp + glucosa al 2%). Se extrajeron colonias individuales de las placas de agar y se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos de 1 ml. La expresión de VHH se indujo añadiendo IPTG (1 mm). Los extractos periplásmicos (en un volumen de ~ 80 µl) se prepararon de acuerdo con los métodos convencionales y se exploraron para determinar la unión al Dll4 de ser humano y de ratón recombinantes en un ensayo de velocidad de disociación Proteon (BioRad, Hercules, CA, USA). En resumen, una microplaca detectora Proteon GLC se recubrió con Dll4 humano recombinante sobre los "canales de ligando" L2 y L4 (con L1/L3 como canal de referencia), mientras que los "canales ligando" L3 y L6 se recubrieron con Dll4 de ratón. El extracto periplásmico de los clones madurados por afinidad se diluyeron 1/10 y se inyectaron a través de los "canales analito" A1-A6. Se calculó una media de velocidad de disociación de los clones de tipo silvestre presentes en la placa y sirvió como una referencia para calcular las mejoras de la velocidad de disociación.

En un segundo ciclo, se creó una biblioteca combinatoria por aleatoriedad simultánea de las posiciones susceptibles identificadas en el ciclo uno. Para esto, se sintetizó ADNc de DLLBII101G8 o DLLBII115A05 de longitud completa por PCR de solapamiento usando oligonucleótidos degenerados (NNS) en las posiciones aleatorizadas y se realizó una PCR de rescate. Los genes VHH aleatorizados se insertaron en un vector de presentación de fagos (pAX50) usando sitios de restricción específicos como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2). La

preparación de extractos periplásmicos de clones VHH individuales se realizó como se ha descrito anteriormente.

La exploración para detectar la unión a Dll4 humano recombinante en un ensayo de velocidad de disociación ProteOn identifica clones con velocidades de disociación de hasta 38 veces (DLLBII101G08) y 11 veces (DLLBII115A05) de mejoradas (Tabla 15).

Tabla 15: Exploración de la velocidad de disociación de clones madurados por afinidad DLLBII101G08 y DLLBII115A05.

	hDll4 k_d (s^{-1})	Veces	mDll4 k_d (s^{-1})	fold
DLLBII101G08	*2,2E-03*	*1*	*6,7E-03*	*1*
DLLBII129D08	5,9E-05	38	1,9E-04	35
DLLBII129H04	6,8E-05	33	2,5E-04	27
DLLBII129G10	7,3E-05	31	2,6E-04	26
DLLBII129H07	7,4E-05	30	2,5E-04	27
DLLBII129B02	7,6E-05	30	2,6E-04	26
DLLBII129E11	8,0E-05	28	2,5E-04	26
DLLBII130F06	6,5E-05	27	2,6E-04	19
DLLBII130B03	6,7E-05	27	2,4E-04	20
DLLBII129D01	8,5E-05	26	2,6E-04	26
DLLBII130D06	6,9E-05	26	3,1E-04	16
DLLBII129G09	8,8E-05	26	3,4E-04	20
DLLBII129B05	9,3E-05	24	3,4E-04	20
DLLBII130E03	7,5E-05	24	2,7E-04	18
DLLBII129H05	9,4E-05	24	3,5E-04	19
DLLBII130A05	7,5E-05	24	3,0E-04	17
DLLBII130B02	7,8E-05	23	2,9E-04	17
DLLBII129H02	9,9E-05	23	3,4E-04	19
DLLBII130B04	8,3E-05	22	2,9E-04	17
DLLBII129E07	1,1E-04	21	2,8E-04	24
DLLBII129E03	1,1E-04	20	3,6E-04	18
DLLBII129A03	1,2E-04	19	3,8E-04	18

Las mejores variantes de DLLBII101G08 y DLLBII115A05 se clonaron en el vector de expresión pAX100 en fase de lectura con una marca c-myc C-terminal y una marca (His) 6. Las velocidades de disociación sobre Dll4 de ratón recombinante también mejoraron. Los VHH se produjeron en *E. coli* como proteínas marcadas con His6 y se purificaron por IMAC y SEC.

Las secuencias de los VHH seleccionados para posterior caracterización se representan en las Tablas 16 (DLLBII101G08) y 17 (DLLBII115A05), respectivamente.

Tabla 16: Variantes de 101G08 maduradas por afinidad

VHH ID **SEC ID Nº**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII 129A03 **21**	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMA	WFRQAPGKER EYVA	AIRWSGGTA YYADSVQG	RFTISRDNAKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCAN	RAPDTRLRP YLYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129B05 **22**	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMA	WYRQAPGKER EYVA	AIRWSGGTA YYADSVQG	RFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAN	RAPDTRLAPY EYDH	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129D08 **23**	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMA	WYRQAPGKER EYVA	AIRWSGGTA YYADSVQG	RFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAN	RAPDTRLEPY LYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129E11 **24**	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMA	WYRQAPGKER EYVA	AIRWSGGTA YYADSVQG	RFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAN	RAPDTRLRP YLYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 129H07 **25**	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMA	WYRQAPGKER EYVA	AIRWSGGTA YYADSVQG	RFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAN	RAPDTRLEPY EYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 130B03 **26**	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMA	WYRQAPGKER EYVA	AIRWSGGTA YYADSVQG	RFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAN	RAPDTRLAPY LYDY	WGQGTQVTVS S
DLLBII 130F06 **27**	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMA	WYRQAPGKER EYVA	AIRWSGGTA YYADSVQG	RFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAN	RAPDTRLAPY EYDY	WGQGTQVTVS S

Tabla 17: Variantes de 115A05 maduradas por afinidad

VHH ID **SEC ID NO**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII13 3A05 **28**	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF G	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGSTFY TDYVKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DRYIWARQGEYW GAYQYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII13 3A09 **29**	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF G	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGSTYY ADYVKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DRYIWARQGEYW GAYAYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII13 3G05 **30**	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF G	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGSTYY TDYVKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DRYIWARQGEYW GAYAYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII13 4D10 **31**	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTI G	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	SINSGGGSTYY TDYVKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DRYIWARQGEYW GAYAYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII13 6C07 **32**	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF G	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	SINSGGGSTYY ADYVKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DRYIWARQGEYW GAYEYDY	WGQGTQVTVSS
DLLBII01 5 **33**	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTI G	SYDMS	WVRRSPGKG PEWVS	AINSGGGSTYY ADYVKG	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	DRYIWARQGEYW GAYAYDY	WGQGTQVTVSS

Ejemplo 7

Caracterización de los VHH anti-Dll4 purificados madurados por afinidad

Las variantes maduradas por afinidad de los VHH DLLBII101G08 y DLLBII115A05 se expresaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). Los VHH se caracterizaron en el ELISA de competencia para hDll4-hNotch1 (Ejemplo 5.1; Tabla 17; Figura10), el FMAT de competencia para CHO-hDll4/hNotch1-Fc y CHO-mDll4/hNotch1-Fc (Ejemplo 5.3, Tabla 18, Figura 11), el ELISA de unión para hDLL1 y hJAG1 y FACS para hDll4/mDll4/cinoDll4 (Ejemplo 5.8, Tabla 19, Figuras 13 y 14, Tabla 20); la determinación de la afinidad de unión para hDll4 y mDll4 en Biacore (Ejemplo 5.7, Tabla 19, Figura 12) y el ensayo indicador mediado por Dll4 (Ejemplo 5.4, Tabla 21; Figura 16).

Los datos de caracterización se resumen en la Tabla 22. En conjunto, los VHH madurados por afinidad muestran mejoras claras en afinidad y potencia, mientras que se observa que su unión a mDll4 y a cino Dll4 se conserva y no se une a hDLL1 o hJAG1.

Tabla 17: Valores CI_{50} (nM) para los VHH madurados por afinidad en ELISA de competencia para hDll4/hNotch1-Fc

VHH ID	**CI_{50} (nM)**
101G08	*10,0*
129A03	1,8
129B05	0,9
129D08	1,2
129E11	1,3
129H07	1,0
130B03	1,5
130F06	1,3
Fab anti-Dll4	1,5

Tabla 18: Valores CI_{50} (nM) de los VHH madurados por afinidad purificados que bloquean la interacción de Notch1/Fc humano con Dll4 de ser humano o de ratón expresado sobre células CHO (FMAT)

	hDll4	**mDll4**
VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**CI_{50} (nM)**
101G08 (peso)	*69,3*	*140,5*
129B05	7,4	14,4
129D08	7,8	11,0
129E11	8,1	12,3
Fab Dll4	5,5	3,0

	hDll4	mDll4
VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**CI_{50} (nM)**
115A05 (peso)	*106,7*	*348,9*
133A09	6,6	18,6
133G05	5,9	12,0
136C07	8,0	31,2
015	5,7	21,2
Fab Dll4	3,4	1,6

Tabla 19: K_D de afinidad (nM) de los VHH madurados por afinidad purificados sobre Dll4 de ser humano y Dll4 de ratón recombinantes

	rhDll4			rmDll4		
VHH ID	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**
101G08 (peso)	*4,8E+04*	*2,3E-03*	*48,0*	*9,4E+04*	*5,6E-03*	*60,0*
129A03	2,1E+05	1,2E-04	0,5			
129B05	2,3E+05	7,9E-05	0,3	2,7E+05	3,1E-04	1,1
129D08	1,8E+05	6,4E-05	0,4	2,7E+05	2,0E-04	0,8
129E11	1,9E+05	9,0E-05	0,5	2,5E+05	2,9E-04	1,2
129H07	1,6E+05	7,3E-05	0,5			
130B03	2,2E+05	6,8E-05	0,3			
130F06	2,0E+05	8,0E-05	0,4			
Fab anti-Dll4	2,3E+05	3,4E-04	1,5			

5

	rhDll4			rmDll4		
VHH ID	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**
115A05 (peso)	*2,5E+05*	*4,0E-03*	*16,0*	*1,7E+05*	*9,1E-03*	*53,0*
133A09	4,4E+05	9,0E-04	2,1	3,5E+05	2,7E-03	7,8
133G05	5,9E+05	4,7E-04	0,8	4,7E+05	1,6E-03	3,4
136C07	6,2E+05	3,9E-04	0,6	5,0E+05	1,3E-03	2,6
015	4,5E+05	4,7E-04	1,0	3,5E+05	1,5E-03	4,3
Fab anti-Dll4	2,3E+05	3,4E-04	1,5			

Tabla 20: Valores CE_{50} (nM) de los VHH madurados por afinidad para la unión sobre CHO-hDll4, CHO- mDll4 y CHO-cDll4 (FACS)

	hDll4	mDll4	cDll4
VHH ID	**CE_{50} (nM)**	**CE_{50} (nM)**	**CE_{50} (nM)**
101G08(peso)	*17,5*		*11,2*
129B05	9,7	3,9	3,9
129D08	9,6	3,7	3,8

129E11	1,4	4,1	4,2
Fab anti-Dll4	5,6	2,1	2,5

	hDll4	**mDll4**	**cDll4**
VHH ID	**CE_{50} (nM)**	**CE_{50} (nM)**	**CE_{50} (nM)**
115A05(peso)	*11,3*		*13,8*
133A09	7,2	1,7	2,3
133G05	8,5	2,8	2,7
136C07	10,9	8,3	3,5
015	14,8	7,0	5,1
Fab anti-Dll4	5,6	2,1	2,5

Tabla 21: Valores CI50 (nM) de los VHH madurados por afinidad en ensayo indicador mediado por Dll4

VHH ID	CI_{50} (nM)
101G08 (peso)	*1940*
129B05	60
129D08	77
129E11	98
Fab Dll4	16

VHH ID	CI_{50} (nM)
115A05 (peso)	*1340*
133A09	87
133G05	104
133H05	25
133H07	35
134D10	18
136C07	226
015	18
Fab Dll4	16

Tabla 22: Características de los VHH madurados por afinidad derivados de DLLBII101G08 y DLLBII115A05

			ELISA	FMAT hDll4	FMAT mDll4	FACS	FACS	FACS	ELISA	ELISA
	K_D (nM) hDll4	K_D (nM) mDll4	CI_{50} (nM)	CI_{50} (nM)	CI_{50} (nM)	CE_{50} (nM)	CE_{50} (nM)	CE_{50} (nM)	hDLL1	hJag-1
101G08	*48,0*	*60,0*	*10,0*	*69,3*	*140,5*	*17,5*	*NF*	*11,2*	*nb*	*nb*
129A03	0,5		1,8							
129B05	0,3	1,1	0,9	7,4	14,4	9,7	3,9	3,9	nb	nb

129D08	0,4	0,8	1,2	7,8	11,0	9,6	3,7	3,8	nb	nb
129E11	0,5	1,2	1,3	8,1	12,3	10,4	4,1	4,2	nb	nb
129H07	0,5		1,0							
130B03	0,3		1,5							
130F06	0,4		1,3							
Fab Dll4	1,5		1,5	5,5	3,0	5,6	2,1	2,5		

			ELISA	FMAT hDll4	FMAT mDll4	FACS	FACS	FACS	ELISA	ELISA
	K_D (nM) hDll4	K_D (nM) mDll4	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)	hDLL1	hJag-1
115A05	*16,0*	*53,0*	*7,5*	*106,7*	*348,9*	*11,3*	*NF*	*13,8*	*nb*	*nb*
133A05			2,1							
133A09	2,1	7,8	1,5	6,6	18,6	7,2	1,7	2,3	nb	nb
133G05	0,8	3,4	2,0	5,9	12,0	8,5	2,8	2,7	nb	nb
134D10			1,3							
136C07	0,6	2,6	1,4	8,0	31,2	10,9	8,3	3,5	nb	nb
015	1,0	4,3	0,9	5,7	21,2	14,8	7,0	5,1	nb	nb
Fab Dll4	1,5		1,2	3,4	1,6	5,6	2,1	2,5		

nb: sin unión

Ejemplo 8

Optimización de secuencia de VHH DLLBII129B05 y DLLBII136C07

La secuencia de aminoácidos de DLLBII129B05 (Figura 17-A) y DLLBII136C07 (Figura 17-B) se alineó con respecto a la secuencia consenso VH3/JH de la línea germinal humana. Los restos se numeraron de acuerdo con Kabat, las CDR se muestran en gris de acuerdo con la definición de AbM (programa informático de modelación de anticuerpo AbM Oxford Molecular).

Los restos a mutar con respecto a su homólogo humano se indican subrayados.

El alineamiento muestra que DLLBII129B05 contiene 4 mutaciones en la región flanqueante con respecto a la secuencia de la línea germinal de referencia. Los restos no humanos en las posiciones 14, 64, 83 y 108 se seleccionaron por sustitución con sus homólogos de la línea germinal humana. Se construyó y se produjo una serie de 2 variantes de DLLBII129B05 (DLLBII017 y DLLBII018) que

llevaban diferentes combinaciones de restos humanos en estas posiciones (Ejemplo 6; las secuencias AA se listan en la Tabla 23).

Para DLLBII136C07, el VHH contiene 4 mutaciones en la región flanqueante con respecto a la secuencia de la línea germinal de referencia. Se seleccionaron restos no humanos en las posiciones 39, 40, 83 y 108 para la sustitución con sus homólogos de la línea germinal humana. Se construyó una serie de 4 variantes de DLLBII136C07 (DLLBII019, DLLBII020, DLLBII021, DLLBII022) que llevaban diferentes combinaciones de restos humanos en estas posiciones (Ejemplo 6; las secuencias AA se listan en la Tabla 24). En paralelo, se eliminó un posible sitio de desamidación Asn en la posición N52-S52a (región CDR2, véase Figura 17-B restos en recuadro) introduciendo una mutación en N52S. En un segundo ciclo, se combinaron mutaciones toleradas procedentes de los intentos de humanización y la sustitución de N52S, dando como resultado la variante de secuencia optimizada DLLBII036. Se construyó una variante adicional de secuencia optimizada (DLLBII039) incluyendo una mutación F29I en CDR1, que se muestra que aumenta la potencia de DLLBII136C07 en el ensayo indicador mediado por Dll4 (Tabla 21; Figura 16).

En la Tala 25 se indica un listado de las dos variantes de DLLBII136C07 de secuencia optimizada.

Todas estas variantes se caracterizan como proteínas purificadas en el ensayo FMAT de competencia para CHO-hDll4/hNotch1-Fc y CHO-mDll4/hNotch1-Fc (ejemplo 5,3; Tabla 26; Figura 18), en el ensayo indicador mediado por Dll4 (Ejemplo 5,4; Tabla 27; Figura 19), el ensayo de proliferación HUVEC de Dll4 (Ejemplo 5,9; Tabla 28) y en Biacore para la determinación de la afinidad (Ejemplo 5,7; Tabla 29). Adicionalmente, la temperatura de fusión (T_m) de cada clon se determinó en un ensayo de cambio térmico, basado en el aumento de la señal de fluorescencia después de la incorporación de Sypro Orange (Invitrogen) (Ericsson *et al*, Anal. Biochem. 357 (2006), págs. 289-298). Todas las variantes mostraron valores T_m similares cuando se compararon con el DLLBII129B05 parental. La Tabla 30 resume los valores T_m a pH 7 de estos clones.

Tabla 23: Secuencias ID y secuencias AA de los VHH anti-Dll4 de secuencia optimizada del DLLBII129B05 parental (FR, región flanqueante; CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID **SEC ID Nº**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII 017 **34**	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAASGRT FS	SYAMA	WYRQA PGKERE YVA	AIRWSGG TAYYADS VQG	RFTISRDNAK NTVYLQMNS LRPEDTAVY YCAN	RAPDTRL APYEYDH	WGQG TLVTV SS
DLLBII 018 **35**	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAASGRT FS	SYAMA	WYRQA PGKERE YVA	AIRWSGG TAYYADS VKG	RFTISRDNAK NTVYLQMNS LRPEDTAVY YCAN	RAPDTRL APYEYDH	WGQG TLVTV SS

Tabla 24: Secuencias ID y secuencias AA de los VHH anti-Dll4 de secuencia optimizada del DLLBII136C07 parental (ciclo 1) (FR, región flanqueante, CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID **SEC ID Nº**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII 019 **36**	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFG	SYDMS	WVRRSP GKGPEW VS	SINSGGGS TYYADYVK G	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLR PEDTAVYYCA A	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTL VTVSS
DLLBII 020 **37**	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFG	SYDMS	WVRQSP GKGPEW VS	SINSGGGS TYYADYVK G	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLR PEDTAVYYCA A	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTL VTVSS
DLLBII 021 **38**	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFG	SYDMS	WVRRAP GKGPEW VS	SINSGGGS TYYADYVK G	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLR PEDTAVYYCA A	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTL VTVSS
DLLBII 022 **39**	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFG	SYDMS	WVRQAP GKGPEW VS	SINSGGGS TYYADYVK G	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLR PEDTAVYYCA A	DRYIWAR QGEYWGA YEYDY	WGQGTL VTVSS

Tabla 25: Secuencias ID y secuencias AA de los VHH anti-Dll4 monovalentes de secuencia optimizada del DLLBII136C07 parental (ciclo 2) (FR, región flanqueante, CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID **SEQ ID Nº**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
DLLBII 036 **40**	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGFTFG	SYDMS	WVRRAP GKGPEW VS	SISSGG GSTYYA DYVKG	RFTISRD NAKNTL YLQMNS LRPEDT AVYYCA A	DRYIWA RQGEY WGAYE YDY	WGQGT LVTVSS
DLLBII 039 **41**	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGFTIG	SYDMS	WVRRAP GKGPEW VS	SISSGG GSTYYA DYVKG	RFTISRD NAKNTL YLQMNS LRPEDT AVYYCA A	DRYIWA RQGEY WGAYE YDY	WGQGT LVTVSS

Tabla 26: Valores CI50 (nM) de los VHH de secuencia optimizada de FMAT de competencia para CHO-hDLL4 y CHO-mDll4

	hDLll4	mDll4
VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**CI_{50} (nM)**
129B05	8,2	15,9
017	12,1	n/d
018	11,0	15,4
Fab Dll4	5,8	4,3

n/d, no determinado

	hDll4	mDll4
VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**CI_{50} (nM)**
136C07	11,4	50,8
019	3,0	n/d
020	44,6	n/d
021	2,1	n/d
022	95,4	n/d
036	9,7	44,7
039	6,2	43,8
Fab Dll4	5,4	4,3

n/d, no determinado

Tabla 27: Valores CI_{50} (nM) de los VHH de secuencia optimizada en ensayo indicador mediado por Dll4

	hDll4
VHH ID	**CI_{50} (nM)**
129B05	108
017	126
018	136
Fab Dll4	23

	hDll4
VHH ID	**CI_{50} (nM)**
136C07	112
019	n/d
020	n/d
021	n/d
022	n/d
036	78
039	16
Fab Dll4	24

n/d, no determinado

Tabla 28: Valores CI_{50} (nM) de los VHH de secuencia optimizada en ensayo de proliferación HUVEC mediado por Dll4

VHH ID	**CI_{50} (nM)**	Inhibición (%)
129B05	3,7	**100**
018	5,3	100
Fab Dll4	4,7	100

VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**Inhibición (%)**
136C07	14,5	**100**
036	7,6	100
039	14,4	100
Fab Dll4	4,7	100

Tabla 29: Afinidad de los VHH de secuencia optimizada (Biacore) (como referencia, Fab de Dll4 tiene una afinidad de 1,5 nM)

VHH ID	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nM)**
129B05	3,4E+05	7,9E-05	0,2
017	3,7E+05	8,0E-05	0,2
018	4,5E+05	9,4E-05	0,2

256

VHH ID	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
136C07	5,5E+05	5,2E-04	1,0
019	5,7E+05	7,4E-04	1,3
020	3,4E+05	9,3E-03	27
021	5,6E+05	5,7E-04	1,0
022	4,7E+05	2,2E-02	46
036	6,6E+05	5,5E-04	0,8
039	4,5E+05	8,1E-04	1,8

Tabla 30: Valores T_m (°C) a pH 7 de los VHH de secuencia optimizada

VHH ID	Tm (°C)
129B05	67,3
017	68,1
018	71,0

VHH ID	Tm (°C)
136C07	68,1
019	69,0
020	69,0
021	69,0
022	70,3
036	71,4
039	69,4

Ejemplo 9

La inmunización con diferentes formatos de VEGF induce una respuesta inmune humoral en llamas

9.1 Inmunizaciones

Después de la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria (Universidad de Ghent, Bélgica), se inmunizaron 4 llamas (denominadas Nº 264, 265, 266, 267) de acuerdo con protocolos convencionales con 6 inyecciones intramuscularares (100 ó 50 μg/dosis a intervalos semanales) de VEGF109 humano recombinante. La primera inyección el día 0 se formuló en adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI, USA), mientras que las inyecciones posteriores se formularon en adyuvante incompleto de Freund (Difco, Detroit, MI, USA). Además, se inmunizaron cuatro llamas (denominadas Nº 234, 235, 280 y 281) de acuerdo con el siguiente protocolo: 5 inyecciones intramusculares con VEGH165 humano conjugado con KLH (100 ó 50 μg/dosis a intervalos quincenales) seguido por 4 inyecciones intramusculares de VEGF109 humano (primera dosis de 100 μg, seguido de 2 semanas después con tres 50 μg/dosis a intervalos semanales).

9.2 Evaluación de respuestas inmunes inducidas por VEGF en llamas

Para controlar titulaciones en suero específicas de VEGF, se estableció un ensayo ELISA en el que se inmovilizaron 2 μg/ml de VEGF165 o VEGF109 de ser humano recombinante durante una noche a 4ºC en una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1%). Después de la adición de soluciones de suero, se detectó la unión de IgG total usando inmunoglobulina de cabra anti-llama conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetramentilbenzidina) (Pierce, Rockford, IL, USA). Para las llamas 264, 265, 266 y 267 se realizó un ELISA adicional en el que se evaluaron las respuestas específicas de los isotipos contra VEGF165 y VEGF109. Las respuestas específicas de los isotipos se detectaron usando mAb de ratón que reconocen específicamente la IgG1 de llama convencional y la IgG2 e IgG3 de llama solo de cadena pesada [Daley *et. al* (2005). Clin. Diagn. Lab. Imm. 12:380-386] seguido de un conjugado de conejo anti-ratón-HRP (DAKO). Los ensayos ELISA se desarrollaron usando TMB como sustrato cromogénico y se midió la absorbancia a 450 nm. En la Tabla 31 se representan las titulaciones en suero de cada llama.

Tabla 31: Respuesta sero-específica mediada por anticuerpos contra VEGF165 y VEGF109. ELISA (fase sólida revestida con proteína recombinante)

		VEGF165 humano recombinante				**VEGF109 humano recombinante**			
Llama	**Inmunógeno**	**IgG Total**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**	**IgG Total**	**IgG1**	**IgG2**	**IgG3**
234	VEGF165-KLH + VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
235	VEGF165-KLH + VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
280	VEGF165-KLH + VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
281	VEGF165-KLH + VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
264	VEGF109	n/d	++	+	+	++	++	+	+
265	VEGF109	n/d	++	+	+	+	++	+	+
266	VEGF109	n/d	++	+	+/-	++	++	+	+/-
267	VEGF109	n/d	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-

n/d no determinado

Ejemplo 10

Selección de los VHH específicos de VEGF mediante presentación de fagos

La clonación de los repertorios del fragmento de anticuerpo solo de cadena pesada y la preparación de fagos se realizó como se describe en el Ejemplo 2. Las fagotecas de VHH se usaron en diferentes estrategias de selección aplicando una multiplicidad de condiciones de selección. Las variables incluyen: i) el formato de proteína VEGF (rhVEGF165, rhVEGF109 o rmVEGF164), ii) el método de presentación de antígenos (fase sólida: placas directamente revestidas o revestidas mediante una marca sobre neutravidina; fase de solución: incubación en solución seguido por la captura sobre placas revestidas con neutravidina), iii) la concentración del antígeno y iv) el método de elución (elución con tripsina o de competencia usando VEGFR2). Todas las selecciones se realizaron en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania).

Las selecciones se realizaron de la siguiente manera: las fagotecas se incubaron a TA con concentraciones variables del antígeno VEGF, en solución o inmovilizado en un soporte sólido. Después de 2 horas de incubación y exhaustivo lavado, los fagos unidos se eluyeron. En el caso de usar tripsina para la elución de fagos, la actividad proteasa se neutralizó inmediatamente por adición de inhibidor de proteasa 0,8 mM AEBSF. Las producciones de fagos que mostraron enriquecimiento sobre el fondo se usaron para infectar *E. coli.* Las células de *E. coli* infectadas se usaron para preparar fagos para la siguiente ronda de selección (rescate de fagos) o se sembraron en placas sobre placas de agar (LB+ amp+glucosa$^{2\%}$) para análisis de clones individuales de VHH. Para explorar una producción de selección para aglutinantes específicos, se recogieron colonias individuales de las placas de agar y se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos de 1 ml. La expresión de VHH controlada por lacZ se indujo añadiendo IPTG (0,1-1 mm final). Se prepararon extractos periplásmicos (en un volumen de ~ 80 ul) de acuerdo con métodos convencionales.

Ejemplo 11

Identificación de los VHH de unión a VEGF (bloqueador no receptor) y bloquedor de VEGF (bloqueador receptor)

Se ensayaron extractos periplásmicos para determinar la unión a VEGF165 humano mediante ELISA. En resumen, se inmovilizaron 2 μg/ml de VEGF165

humano recombinante durante una noche a 4ºC en una placa MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1%). Después de la adición de típicamente una dilución 10 veces de los extractos periplásmicos, la unión de VHH se detectó usando un anti-myc de ratón (Roche) y un conjugado de anti-ratón-HRP (Dako). Los clones que mostraron señales ELISA >3 veces por encima del fondo se consideraron como VHH unidos a VEGF.

Además, se exploraron extractos periplásmicos en un ensayo AlphaScreen de VEGF165 humano/VEGFR2 humano para evaluar la capacidad bloqueante de los VHH. El VEGF165 humano se biotiniló usando Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce, Rockford, IL, USA). La quimera VEGFR2/Fc humana (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) se capturó usando un VHH anti-Fc humano que estaba acoplado a perlas aceptoras de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer, Waltham, MA, US). Para evaluar la capacidad neutralizante de los VHH, se diluyeron extractos periplásmicos 1/25 en tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,03% (Sigma-Aldrich) y se preincubaron con VEGF165 humano biotinilado 0,4 nM durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). A esta mezcla se añadieron las perlas aceptoras (10 μg/ml) y VEGFR2-huFc 0,4 nM y después se incubó durante 1 hora a TA en la oscuridad. Posteriormente se añadieron perlas donantes (10 μg/ml) seguido de incubación durante 1 hora a TA en la oscuridad. La fluorescencia se midió mediante placas de lectura sobre un lector Envision Multi Label Plate (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) usando una longitud de onda de excitación de 680 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm y 620 nm. El extracto periplásmico que contenía el VHH irrelevante se usó como control negativo. Los extractos periplásmicos que contenían los VHH anti-VEGF165 que eran capaces de disminuir la señal de fluorescencia en más del 60% con respecto a la señal del control negativo se identificaron como un acierto. Todos los aciertos identificados en el AlphaScreen se confirmaron en un ELISA de competencia. Con este fin, se aplicó como revestimiento 1 μg/m de quimera VEGFR2 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a una placa MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Se incubaron diluciones de cinco veces los extractos periplásmicos en presencia de una concentración fija (4 nM) de VEGF165 humano biotinilado en tampón PBS que contenía caseína al 0,1% y Tween 20 al 0,05% (Sigma-Aldrich). La unión de estos complejos VHH/bio-VEGF165 a la placa revestida con la quimera

VEGFR2 humana se detectó usando extravidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, St Louis, MO, USA). Las secuencias ID y las correspondientes secuencias AA de los VHH inhibidores (bloqueador receptor) y los VHH de unión a VEGF (bloqueador no receptor) seleccionadas para caracterización adicional se indican en la Tabla 32 y Tabla 33, respectivamente.

Tabla 32: Secuencias ID y secuencias AA de los VHH monovalentes anti-VEDF bloqueante-receptor seleccionadas para caracterización adicional (FR, región flanqueante; CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID/ **SEC ID Nº:**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
VEGFBII 23A06 **42**	EVQLVE SGGGLV QPGDSL KLSCAF SGRTFS	SYSM G	WFRQA QGKERE FVV	AISSGGF IYDAVSL EG	RFTISRDNTK NTVYLQTPSL KPEDTAVYYC AA	SRAYGS SRLRLAD TYDY	WGQGT QVTVSS
VEGFBII 23B04 **43**	EVQLVE SGGGLV QTGDSL RLSCEV SGRTFS	SYSM G	WFRQA QGKERE FVV	AISKGGY KYDSVSL EG	RFTISKDNAK NTVYLQINSL KPEDTAVYYC AS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGT QVTVSS
VEGFBI I 24C04 **44**	EVQLVE SGGGLV QPGDSL KLSCVA SGRTSS	SYSM G	WFRQA QGKERE FVV	AISSGGY IYDSVSL QG	RFTISRDNTK NTVYLQTPSL KPEDTAVYYC AA	SRAYGS SRLRLAD TYDY	WGQGT QVTVSS

Tabla 33: Secuencias ID y secuencias AA de los VHH monovalentes anti-VEGF bloqueante-no receptor seleccionadas para caracterización adicional (FR, región flanqueante; CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID/ **SEC ID Nº:**	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
VEGFBII 05B05 **45**	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCVA SGIRFM	SMA	WYRQ APGKH RELVA	RISSGG TTAYV DSVKG	RFTISRDN SKNTVYLQ MNSLKAE DTAVYYC NT	FSSRPNP	WGA GTQV TVSS
VEGFBII 10E07 **46**	EVQLVE SGGGLV QAGGSL RLSCAA SGRTFS	NYAM G	WFRQ APGKE RVLVA	DISSSG INTYVA DAVKG	RFTISRDN AKNTVYLQ MNSLKPE DTAVYYCA A	SAWWYS QMARDN YRY	WGQ GTQV TVSS

261

VEGFBII 86H09 **47**	EVQLVE SGGGLV QAGGSL RLSCTA SGSAFK	SYRM G	WFRR TPGKE DEFVA	SISWTY GSTFY ADSVK G	RFTMSRD KAKNAGYL QMNSLKP EDTALYYC AA	GAQSDR YNIRSYD Y	WGQ GTQV TVSS

Las velocidades de disociación de los VHH bloqueante-receptor se analizaron en Biacore (instrumento Biacore T100, GE Healthcare). Como tampón de desarrollo se usó HBS-EP + tampón y los experimentos se realizaron a 25ºC. El VEGF165 humano recombinante se capturó de manera irreversible en una placa detectora CM5 mediante acoplamiento con amina (usando EDC y NHS) hasta un nivel diana de +/- 1500 RU. Después de la inmunización, las superficies se desactivaron con inyección durante 10 minutos de etanolamina 1M pH 8,5. Se activó y desactivó una superficie de referencia con EDC/NHS respectivamente y etanolamina. Los extractos periplásmicos de los VHH se inyectaron hasta una dilución de 10 veces en tampón de desarrollo durante 2 minutos a 45 µl/minuto y se dejó que se disociara durante 10 ó 15 minutos. Entre las muestras diferentes, las superficies se regeneraron con tampón de regeneración. Los datos se indican por duplicado mediante la sustracción de las curvas en el canal de referencia y de una inyección de tampón de desarrollo vacio. La fase de disociación de las curvas procesadas se evaluó ajustando un modelo de descomposición bifásico en el programa informático de evaluación Biacore T100 v2.0.1. En la Tabla 34 se muestra una lista de los valores k_d-rápida, k_d- lenta y el %.

Tabla 34: Determinación de la constante de disociación de los VHH bloqueante-receptor con Biacore

VHH ID	k_d(rápida)	k_d(lenta)	% de rapidez	Nivel de unión (RU)
VEGFBII23B04	8.80E-03	4.00E-05	12	768
VEGFBII24C04	1.30E-02	3.40E-05	17	456
VEGFBII23A06	1.70E-02	3.70E-05	13	547

Ejemplo 12

Caracterización de los VHH anti-VEGF purificados

Se seleccionaron tres VHH anti-VEGF inhibidores, para caracterización adicional, como proteínas purificadas: VEGFBII23B04, VEGFBII24C04 y VEGFBII23A06. Estos VHH se expresaron en TG1 de *E. coli* como proteínas c-myc,

262

marcadas con His6.

La expresión se indujo por adición de IPTG 1 mM y se dejó continuar durante 4 horas a 37ºC. Después de centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplásmicos por congelación-descongelación de los sedimentos. Estos extractos se usaron como material de partida para purificación de VHH mediante IMAC y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Las preparaciones finales de VHH mostraron una pureza del 95% según se ensayó mediante SDS-PAGE.

12.1 Evaluación de los VHH bloqueadores de VEGF165/VEGFR2 de ser humano en ELISA bloqueador para VEGF165 humano/VEGFR2-Fc humano

La capacidad bloqueadora de los VHH se evaluó en un ELISA bloqueador para VEGF165 humano/VEGFR2-Fc humano. En resumen, se aplicó como revestimiento 1 µg/ml de la quimera VEGFR2-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Se incubaron diluciones en serie (intervalo de concentración 1 mM – 64 pM) de los VHH purificados en tampón PBS que contenía caseína al 0,1% y Tween 20 al 0,05% (Sigma) en presencia de VEGF165 biotinilado 4 nM. La unión residual de bio-VEGF165 a VEGFR2 se detectó usando peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con extravidina (Sigma, St Louis, MO, USA) y TMB como sustrato. Como controles se tomaron Bevacizumab (Avastin®) y Ranibizumab (Lucentis®). Las curvas de inhibición de la dosis se muestran en la Figura 20, los valores CI_{50} y el % de inhibición correspondientes se resumen en la Tabla 35.

Tabla 35: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición para los VHH monovalentes en ELISA de competencia para hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**% inhibición**
VEGFBII23B04	2.1	100
VEGFBII23A06	3.0	100
VEGFBII24C04	2.5	100
Ranibizumab	1.6	100
Bevacizumab	1.7	100

12.2 Evaluación de los VHH bloqueadores de VEGF165/VEGFR2 de ser humano en ELISA bloqueador para VEGF165 humano/VEGFR1-Fc humano

Los VHH también se evaluaron en un ELISA bloqueador para VEGF165

humano/VEGFR1-Fc humano. En resumen, se aplicaron como revestimiento 2 µg/ml de quimera VEGFR1-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a una placa MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Se incubaron diluciones en serie (intervalo de concentración de 1 mM-64 pM) de los VHH purificados en tampón PBS que contenía caseína al 0,1% y Tween 20 al 0,05% (Sigma) en presencia de VEGF165 biotinilado 0,5 nM.

Se detectó unión residual de bio-VEGF165 con VEGFR1 usando peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con extravidina (Sigma, St Louis, MO, USA) y TMB como sustrato. Como controles se tomaron Bevacizumab, Ranibizumab y un VHH irrelevante (2E6). Las curvas de inhibición se muestran en la Figura 21, los valores CI_{50} y % de inhibición correspondientes se resumen en la Tabla 36.

Tabla 36: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición de los VHH monovalentes en ELISA de competencia para hVEGF165/hVEGFR1-Fc.

VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**% inhibición**
VEGFBII23B04	0,5	64
VEGFBII23A06	0,9	55
VEGFBII24C04	0,8	71
Ranibizumab	1,2	91
Bevacizumab	1,5	96

12.3 Evaluación de los VHH anti-VEGF165 en AlphaScreen bloqueador *para VEGF165 humano/VEGFR2-Fc humano*

También se evaluó la capacidad bloqueadora de los VHH en un AlphaScreen bloqueador para VEGF165 humano/VEGFFR2-Fc humano. En resumen, se añadieron diluciones en serie de los VHH purificados (intervalo de concentración: 200 nM – 0,7 pM) en tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,03% (Sigma) a bio-VEGF165 4 pM y se incubó durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron perlas aceptoras revestidas con VEGFR2-Fc (0,4 nM) y VHH anti-Fc (20 µg/ml) y esta mezcla se incubó durante 1 hora en la oscuridad. Finalmente, se añadieron perlas donantes de estreptavidina (20 µg/ml) y después de 1 hora de incubación en la oscuridad, se midió la fluorescencia en el lector microplaca Envision. En la Figura 22 se muestran las curvas de respuesta a la dosis. Los valores CI_{50} para los VHH que bloquean la interacción VEGF165 humano-VEGFR2-Fc humano se resumen en la Tabla 37.

Tabla 37: Valores CI_{50} (pM) y % de inhibición para los VHH en AlphaScreen de competencia para hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	CI_{50} (pM)	% inhibición
VEGFBII23B04	160	100
VEGFBII23A06	250	100
VEGFBII24C04	250	100
Ranibizumab	860	100

12.4 Evaluación de los VHH anti-VEGF165 en AlphaScreen bloqueador para VEGF165 humano/VEGFR1-Fc humano

También se evaluó la capacidad bloqueadora de los VHH en un AlphaScreen bloqueador para VEGF165 humano/VEGFR1-Fc humano. En resumen, se añadieron diluciones en serie de los VHH purificados (intervalo de concentración: 500 nM – 1,8 pM) en tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,03% (Sigma) a bio-VEGF165 0,4 nM y se incubó durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron perlas aceptoras revestidas con VEGFR1-Fc (1 nM) y VHH anti-Fc (20 μg/ml) y esta mezcla y se incubó durante 1 hora en la oscuridad. Finalmente, se añadieron perlas donantes de estreptavidina (20 μg/ml) y después de 1 hora de incubación en la oscuridad, se midió la fluorescencia en el lector microplaca Envision. En la Figura 23 se muestran las curvas de respuesta a la dosis. Los valores CI_{50} y % de inhibición para los VHH que bloquean la interacción VEGF165 humano-VEGFR1-Fc humano se resumen en la Tabla 38.

Tabla 38: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición para los VHH en AlphaScreen de competencia para hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	CI_{50} (nM)	% inhibición
VEGFBII23B04	0,9	41
VEGFBII23A06	0,4	46
VEGFBII24C04	0,2	53
Ranibizumab	3,3	79

12.5 Determinación de la actividad de la interacción VEGF165 humano-VHH

Se analizó la cinética de la unión del VHH VEGFBII23B4 con hVEGF165 por SPR en un instrumento Biacore T100. VEGF165 humano recombinante se inmovilizó directamente en una microplaca CM5 mediante acoplamiento con amina

(usando EDC y NHS). Los VHH se analizaron a diferentes concentraciones entre 10 y 360 nM. Las muestras se inyectaron durante 2 minutos y se permitió la disociación hasta 20 minutos a un caudal de 45 µl/min. Entre las inyecciones de la muestra, la superficie de la microplaca se regeneró con HCl 100 mM. Se usó HBS-EP + (tampón Hepes pH 7,4 + EDTA) como tampón de desarrollo. Las curvas de unión se ajustaron usando un modelo de reacción de dos estados mediante el programa informático de evaluación Biacore T100 v2.0.1. Las afinidades calculadas de los VHH anti-VEGF se indican en la Tabla 39.

Tabla 39: K_D de afinidad de los VHH purificados para VEGF165 humano recombinante

	VEGF165						
VHH ID	**k_a ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**k_{a1} ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**k_{a2} ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**k_{d1} (s^{-1})**	**k_{d2} (s^{-1})**	**K_D (nM)**
VEGFBII23B04 (a)	-	2,1E+05	1,4E-02	-	8,6E-03	2,4E-04	0,7
VEGFBII23A06 (a)	-	4,2E+05	2,0E-02	-	5,7E-02	1,0E-04	0,7
VEGFBII24C04 (a)	-	3,2E+05	1,8E-02	-	2,6E-02	9,6E-05	0,4

([a]) curva de unión heterogénea resultante en el ajuste 1:1, las curvas se ajustan usando un modelo de Reacción de Dos Estados por el Programa Informático de Evaluación Biacore T100 v2.0.1

12.6 Unión a VEGF164 de ratón

Se determinó la reactividad cruzada con respecto a VEGF164 de ratón usando un ELISA de unión. En resumen, se aplicó como revestimiento 1 µg/ml de VEGF164 de ratón recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) durante una noche a 4ºC a una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1% en PBS). Los VHH se aplicaron como series de dilución (intervalo de concentración: 500 nM – 32 pM) en tampón PBS que contenía caseína al 0,1% y Tween 20 al 0,05% (Sigma) y la unión se detectó usando un anti-myc de ratón (Roche) y un conjugado de anti-ratón-HRP (DAKO) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetramentilbenzidina) (Pierce, Rockford, IL, USA) (Figura 24). Como control positivo se incluyó un mAb reactivo con VEGF164 de ratón. Como referencia, también se midió la unión a VEGF165 humano. Los valores CE_{50} se resumen en la Tabla 40.

Tabla 40: Valores EC_{50} (pM) para los VHH en un Elisa de unión a VEGF165 humano y 164 de ratón recombinantes

	rhVEGF165	**rmVEGF164**
VHH ID	**CE_{50} (pM)**	**CE_{50} (pM)**
VEGFBII23B04	297	Sin unión
VEGFBII24C04	453	Sin unión
VEGFBII23A06	531	Sin unión

12.7 Unión a VEGF121

Se evaluó la unión a VEGF121 humano recombinante mediante un ELISA de unión en fase sólida. En resumen, se aplicó como revestimiento 1 µg/ml de VEGF121 humano recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) durante una noche a 4ºC a una placa MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1% en PBS). Los VHH se aplicaron como series de dilución (intervalo de concentración: 500 nM – 32 pM) en tampón PBS que contenía caseína al 0,1% y Tween 20 al 0,05% (Sigma) y la unión se detectó usando un anti-myc de ratón (Roche) y un conjugado anti-ratón-HRP (DAKO) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetramentilbenzidina) (Pierce, Rockford, IL, USA) (Figura 25). Como control positivo se tomaron diluciones en serie de VEGFR2. Los valores CE_{50} se resumen en la Tabla 41.

Tabla 41: Valores CE_{50} (pM) para los VHH monovalentes en un ELISA de unión para VEGF121 humano recombinante

VHH ID	**CE_{50} (pM)**
VEGFBII23B04	510
VEGFBII24C04	792
VEGFBII23A06	928

12.8 Unión a miembros de la familia VEGF VEGFB, VEGFC, VEGFD y PlGF

Se evaluó la unión a VEGFB, VEGFC, VEGFD y PlGF mediante un ELISA de unión en fase sólida. En resumen, se aplicó como revestimiento 1 µg/ml de

VEGFB, VEGFC, VEGFD y PIGF (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) durante una noche a 4ºC a una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1% en PBS). Los VHH se aplicaron como diluciones en serie (intervalo de concentración: 500 nM – 32 pM) y la unión se detectó usando un anti-myc de ratón (Roche) y un conjugado anti-ratón-AP (Sigma, St Louis, MO, USA). Como controles positivos se tomaron diluciones en serie de los receptores apropiados y se detectó con IgG de cabra anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP), anticuerpo específico de Fc (Jackson Inmuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetramentilbencidina) (Pierce, Rockford, IL, USA). En la Figura 26 se muestran las curvas de respuesta a la dosis y los controles. Los resultados muestran que no hay unión detectable de los VHH seleccionados a VEGFB, VEGFC, VEGFD o PIGF.

12.9 Unión al epítopo

Se realizaron experimentos de unión a epítopo basados en Biacore para investigar cuales de los aglutinantes VEGF se unían a un epítopo similar o solapante como VEGFBII23B04. Con este fin, se inmovilizó VEGFBII23B04 sobre una microplaca detectora CM5. Para cada muestra, se pasó VEGF165 humano sobre la superficie de la microplaca y fue capturado de manera reversible por VEGFBII23B4. Después, se inyectaron los VHH purificados (100 nm) o los extractos periplásmicos (diluidos 1/10) con un tiempo de contacto superficial de 240 segundos y un caudal de 10 ul/minuto. Entre las muestras diferentes, la superficie se regeneró con tampón de regeneración (HCl 100 mM). Las curvas procesadas se evaluaron con el programa informático de evaluación Biacore T100. Los VHH pudieron dividirse en dos grupos: un grupo que proporcionó unión adicional a VEGF165 capturado por VEGFBII23B04 y un segundo grupo que no era capaz de unirse de manera simultánea a VEGF165 capturado por VEGFBII23B04 (en este grupo se encuentran los VHH seleccionados 24C04, 23A06 y 23B04)

Se usó el mismo ensayo preparado para evaluar si VEGFR1, VEGFR2,Ranibizumab y Bevacizumab podían unirse a VEGF-165 humano al mismo tiempo que a VEGFBII23B04. La Tabla 42 presenta las respuestas de unión adicionales a VEGF165 capturado en VEGFBII23B04. Tan sólo VEGFR2 no pudo unirse a VEGF165 capturado en VEGFBII23B04, poniendo de manifiesto la capacidad bloqueante de VEGFBII23B04 para la interacción VEGF-VEGFR2.

Además, estos datos muestran que el epítopo VEGFBII23B04 no corresponde al epítopo de Bevacizumab ni de Ranibizumab.

Tabla 42: Unión al epítopo de VEGFBII23B04 - unión de inhibidores de referencia o receptores afines a VEGF165 capturado en VEGFBII23B04

Etapa de inyección	**Unión**	**[muestra]**	**Nivel de unión (RU)**
1	VEGF165	100 nM	1727
2	VEGFBII23B04	100 nM	-
3	Ranibizumab	100 nM	763
4	Bevacizumab	100 nM	1349
5	VEGFR1	100 nM	1011
6	VEGFR2	100 nM	-

12.10 Caracterización de los VHH anti-VEGF en el ensayo de proliferación HUVEC

La potencia de los VHH seleccionados se evaluó en un ensayo de proliferación. En resumen, células HUVEC primarias (Technoclone) se privaron de complemento durante una noche y después se sembraron 4000 células/pocillo por cuadruplicado en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Las células se estimularon en ausencia o presencia de los VHH con 33 ng/ml de VEGF. Las tasas de proliferación se midieron incorporando [^{3}H] timidina el día 4. Los resultados del ensayo de proliferación HUVEC mostrados en la Tabla 43, demuestran que VEGFBII23B04 y Bevacizumab inhiben la proliferación de HUVEC inducida por VEGF en más de un 90% con valores CI_{50} <1nM.

Tabla 43: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición de VEGFBII23B04, VEGFBII23A06 y VEGFBII24C04 monovalente en el ensayo de proliferación HUVEC para VEGF

VHH ID	***CI_{50} (nM)***	***% inhibición***
VEGFBII 23B04	0,36	91
Bevacizumab	0,21	92

VHH ID	***CI_{50} (nM)***	***% inhibición***
VEGFBII 23A06	4,29	73
VEGFBII 24C04	3,8	79
Bevacizumab	0,78	78

269

12.11 Caracterización de los VHH anti-VEGF en el ensayo de fosforilación de Erk en HUVEC

La potencia de los VHH seleccionados se evaluó en el ensayo de fosforilación de ERk en HUVEC En resumen, células HUVEC primarias se privaron de suero durante una noche y después se estimularon en ausencia o presencia de los VHH con 10 ng/ml de VEGF durante 5 minutos. Las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y los niveles de fosforilación de ERK se midieron por ELISA usando anticuerpos específicos de fosfoERK (anti-fosfoMAP quinasa pERK1 y 2, M8159, Sigma) y conjugado de inmunoglobulina policlonal de conejo anti-ratón con HRP (PO161, Dako). Como se muestra en la Tabla 44, VEGFBII23B4 y Bevacizumab inhiben la fosforilación de Erk inducida por VEGF en al menos un 90%, con valores CI_{50} < 1nM.

Tabla 44: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición de VEGFBII23B04 monovalente en el ensayo de fosforilación HUVEC Erk VEGF

VHH ID	***CI_{50} (nM)***	***% inhibición***
VEGFBII 23B04	*0,37*	*90*
Bevacizumab	*0,63*	*98*

Ejemplo 13

Generación de los VHH bloqueadores anti-VEGF multivalentes

El VHH de VEGFBII23B04 se fusionó genéticamente con VEGFBII23B04 dando como resultado un VHH homodimérico o con diferentes VHH de unión a VEGF dando como resultado VHH heterodiméricos (bivalentes). Para generar los VHH bivalentes, un panel de 10 VHH propios de unión a VEGF se unió a VEGFBII23B04, mediante un enlazador flexible de 9 ó 40 Gly-Ser en dos orientaciones diferentes. El VEGFBII23B04 homodimérico (VEGFBII010) y los 40 VHH bivalentes heterodiméricos VHH se expresaron en TG1 de *E. coli* como proteínas c-myc marcadas con His6. La expresión se indujo por adición de IPTG 1 mM y se dejó continuar durante 4 horas a 37ºC. Después de centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplásmicos por congelación-descongelación del sedimento. Estos extractos se usaron como material de partida y los VHH se purificaron mediante IMAC y desalinización dando como resultado una pureza del 90% según se evalúa mediante SDS-PAGE. En las SEC ID Nos: 48-53 y en la

Tabla 45 se muestran las secuencias AA, los VHH homodiméricos y de unión a VEGF bivalentes seleccionados.

Tabla 45: Secuencias ID, VHH ID y secuencia AA de los VHH anti-VEGF bivalentes seleccionados

VHH ID/ SEC ID Nº:	**VHH ID**	**Secuencia AA**
VEGFBII23B04-35GS-23B04 **48**	VEGFBII010	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS-5B05 **49**	VEGFBII022	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFMSMAWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSS
VEGFBII23B04-40GS-5B05 **50**	VEGFBII021	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFMSMAWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSS

271

VEGFBII23B04-40GS-10E07 **51**	VEGFBII023	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKERVLVADISSSGINTYVADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASAWWYSQMARDNYRYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-40GS-86H09 **52**	VEGFBII024	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSAFKSYRMGWFRRTPGKEDEFVASISWTYGSTFYADSVKGRFTMSRDKAKNAGYLQMNSLKPEDTALYYCAAGAQSDRYNIRSYDYWGQGTQVTVSS
VEGFBII10E07-40GS-23B04 **53**	VEGFBII025	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKERVLVADISSSGINTYVADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASAWWYSQMARDNYRYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS

El panel de los 40 VHH bivalentes se ensayó en el ensayo AlphaScreen bloqueador para VEGFR2 y VEGFR1, como se ha descrito en el ejemplo 12.3 y 12.4 respectivamente. Basándose en la potencia y nivel máximo de inhibición, se seleccionaron los cinco mejores VHH bivalentes (VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBI023, VEGFBI024 y VEGFBII025 - véase Tabla 45) caracterización adicional. En la Tabla 46 se muestra una visión de conjunto de los resultados de la exploración de los cinco VHH bivalentes seleccionados en el AlphaScreen de competencia para VEGFR2 y VEGFR1.

Tabla 46: Potencia y eficacia de los cinco VHH bivalentes biespecíficos

seleccionados en el ensayo AlphaScreen de competencia para VEGF/VEGFR1 y VEGF/VEGFR2

VHH ID	VEGFR2	VEGFR1	
	CI_{50} (pM)	CI_{50} (pM)	% inhibición
VEGFBII021	9	16	100
VEGFBII022	7	8	100
VEGFBII023	38	44	91
VEGFBII024	12	46	100
VEGFBII025	51	39	82

Ejemplo 14

Caracterización de los VHH anti-VEGF formateados

Los VHH VEGFBII010, VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBII023, VEGFBII024 y VEGFBII025 se compararon uno al lado del otro en el ELISA bloqueador para VEGFR2 y VEGFR1 (Figura 27 y 28, Tabla 47 y Tabla 48, respectivamente) y el ensayo AlphaScreen (Figura 29 y 30, Tabla 49 y 50) como se describe en los Ejemplos 12.1, 12.2, 12.3 y 12.4, respectivamente.

Tabla 47: Valores CI_{50} (pM) y % de inhibición para los VHH formateados en ELISA de competencia para hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	CI_{50} (pM)	% inhición
VEGFBII010	49	100
VEGFBII021	204	100
VEGFBII022	164	100
VEGFBII023	213	100
VEGFBII024	292	100
VEGFBII025	577	100
Bevacizumab	315	100
Ranibizumab	349	100

Tabla 48: Valores CI_{50} (pM) y % de inhibición de los VHH formateados en ELISA de competencia para VEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	CI_{50} (pM)	% inhibición
VEGFBII010	73.5	67
VEGFBII021	254	97
VEGFBII022	225	89
VEGFBII023	279	91
VEGFBII024	326	92
VEGFBII025	735	91
Bevacizumab	484	91
Ranibizumab	594	96

273

Tabla 49: Valores CI_{50} (pM) y % de inhibición para los VHH formateados en AlphaScreen de competencia para hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	CI_{50} (pM)	% inhibición
VEGFBII010	16	100
VEGFBII021	7	100
VEGFBII022	7	100
VEGFBII023	46	100
VEGFBII024	50	100
VEGFBII025	51	100
Ranibizumab	600	100

Tabla 50: Valores CI_{50} (pM) y % de inhibición de los VHH formateados en AlphaScreen de competencia para VEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	CI_{50} (pM)	% inhibición
VEGFBII010	21	70
VEGFBII021	12	100
VEGFBII022	9	98
VEGFBII023	48	87
VEGFBII024	69	98
VEGFBII025	71	82
Ranibizumab	1300	87

Además, los VHH formateados también se ensayaron en relación con su capacidad para bloquear la interacción mVEGF164/mVEGFR2-huFc. En resumen, se añadieron diluciones en serie de los VHH purificados (intervalo de concentración: 4 μM – 14,5 pM) en tampón de ensayo que contenía Tween 20 al 0,03% (Sigma) a mVEGF164 biotinilado 0,1 nM y se incubó durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron perlas aceptoras revestidas con VEGFR2-huFc de ratón (0,1 nM) y VHH anti-huFc 8 (20 μg/ml) y esta mezcla se incubó durante 1 hora. Finalmente, se añadieron perlas donantes de estretavidina (20 μg/ml) y después de una hora de incubación se midió la fluorescencia en el lector microplaca Envision. Las curvas de respuesta a la dosis se muestran en la Figura 31. En la Tabla 51 se resumen los valores CI_{50} para los VHH que bloquean la interacción VEGF164/VEGFR2-huFC.

Tabla 51: Valores CI_{50} (pM) y porcentaje de inhibición para los VHH anti-VEGF formateados en AlphaScreen de competencia para mVEGF164/mVEGFR2-hFc.

VHH ID	CI_{50} (nM)	% inhibición
VEGFBII022	108	100
VEGFBII024	-	-
mVEGF164	0,05	100
Ranibizumab	-	-

Los VHH formateados también se ensayaron en ELISA para detectar su capacidad para unirse a mVEGF164 y rhVEGF165 (Ejemplo 12.6; Figura 32; Tabla 52), a VEGF121 (Ejemplo 12.7; Figura 34; Tabla 53) y a los miembros de la familia VEGF, VEGFB, VEGFC, VEGFD y PlGF (Ejemplo 12.8; Figura 33). La cinética de unión para VEGF165 humano se analizó como se describe en el Ejemplo 12.5. Los valores K_D se indican en la Tabla 54.

Tabla 52: Valores CE_{50} (pM) para los VHH formateados en un ELISA de unión a VEGF165 humano y VEGF164 de ratón recombinantes.

	rhVEGF165	rmVEGF164
VHH ID	**CE_{50} (pM)**	**CE_{50} (pM)**
VEGFBII010	428	-
VEGFBII021	334	502
VEGFBII022	224	464
VEGFBII023	221	-
VEGFBII024	320	-
VEGFBII025	668	-

Tabla 53: Valores CE_{50} (pM) para los VHH formateados en un ELISA de unión a VEGF121 humano recombinante.

	rhVEGF121
VHH ID	**CE_{50} (pM)**
VEGFBII010	920
VEGFBII022	540
VEGFBII024	325
VEGFBII025	475

Tabla 54: K_D de afinidad (nM) de los VHH formateados purificados para VEGF165 humano recombinante

VHH ID	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)	k_{a2} (1/s)	k_{d2} (1/s)	K_D (nM)[a]
VEGFBII010 [b]	4,5E+05	1,7E-02	2,9E-02	1,3E-04	0,16
VEGFBII021[b]	1,2E+06	1,1E-02	2,3E-02	1,9E-04	0,07

VEGFBII022[(b)]	1,2E+06	9,1E-03	1,4E-02	2,6E-04	0,14
VEGFBII023[(b)]	3,0E+05	1,8E-02	2,4E-02	2,7E-04	0,69
VEGFBII024[(b)]	3,0E+05	1,3E-02	2,6E-02	2,8E-04	0,47
VEGFBII025[(b)]	3,3E+05	1,7E-02	1,8E-02	3,7E-04	1,1

[(a)] $K_D = k_{d1}/k_{a1}*(k_{d2}/(k_{d2}+k_{a2}))$

[(b)] Las curvas se ajustaron usando un modelo Reacción de Doble Estado por el programa informático de Evaluacion Biacore T100 v2.0.1.

Los VHH VEGFBII010, VEGFBII022, VEGFBII024 y VEGFBII025 también se ensayaron en el ensayo de fosforilación de Erk y de proliferación HUVEC mediado por VEGF.

La potencia de los VHH formateados seleccionados se evaluó en un ensayo de proliferación. En resumen, células HUVEC primarias (Technoclone) se privaron de complemento durante una noche y después se sembraron 4.000 células/pocillo por cuadruplicado en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Las células se estimularon en ausencia o presencia de los VHH con 33 ng/ml de VEGF. Las tasas de proliferación se midieron incorporando [^{3}H] Timidina el día 4. Los resultados mostrados en la Tabla 55 demuestran que los VHH formateados y Bevacizumab inhiben la proliferación HUVEC inducida por VEGF en más de un 90% con valores CI_{50} < 1 nM.

Tabla 55: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición de los VHH formateados en el ensayo de proliferación HUVEC para VEGF.

VHH ID	**CI_{50} (nM)**	**% inhibición**
VEGFBII010	0,22	95
VEGFBII021	0,40	98
VEGFBII022	0,34	100
VEGFBII023	0,52	98
VEGFBII024	0,38	96
VEGFBII025	0,41	104
Bevacizumab	0,21	92

La potencia de los VHH formateados seleccionados también se ensayó en el ensayo de fosforilación de Erk en HUVEC. En resumen, células HUVEC primarias se privaron de suero durante una noche y después se estimularon en ausencia o presencia de los VHH con 10 ng/ml de VEGF durante 5 minutos. Las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y los niveles de fosforilación de ERK se midieron por ELISA usando anticuerpos específicos de fosfoERK (anti-fosfoMAP

quinasa pERK12, M8159, Sigma) y conjugado de inmunoglobulina policlonal de conejo anti-ratón con HRP (PO161, Dako). Como se muestra en la Tabla 56, los VHH formateados y Bevacizumab inhiben la fosforilación de Erk inducida por VEGF en más de un 90%, con valores CI_{50} < 1 nM.

Tabla 56: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición de los VHH formateados en el ensayo de fosforilación de Erk en HUVEC para VEGF

VHH ID	CI_{50} (nM)	% inhibición
VEGFBII010	0,19	92
VEGFBII021	0,21	103
VEGFBII022	0,18	94
VEGFBII023	0,25	100
VEGFBII024	0.23	94
VEGFBII025	0,23	99
Bevacizumab	0,63	98

Ejemplo 15

Optimización de Secuencia

15.1 Optimización de Secuencia de VEGFBII23B04

La secuencia de aminoácidos de VEGFBII23B04 se alineó con las secuencias germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5, véase la Figura 35 SEC ID Nº: 100. El alineamiento muestra que VEGFBII23B04 contiene 19 mutaciones en la región flanqueante con respecto a la secuencia de la línea germinal de referencia. Los restos no humanos en las posiciones 14, 16, 23, 24, 41, 71, 82, 83 y 108 se seleccionan para la sustitución con sus homólogos de la línea germinal humana. Se generó una serie de 8 variantes de VEGFBII23B04 llevando diferentes combinaciones de restos humanos en estas posiciones (la secuencia AA se indica en la Tabla 57). Se construyó una variante adicional en la que el posible sitio de isomerización en la posición D59S60 (región CDR2, véase Figura 35 indicada como restos en negrita en cursiva) se eliminó por introducción de una mutación en S60A.

Tabla 57: Secuencias AA de variantes de VHH VEGFBII23B04 de secuencia optimizada (FR, región flanqueante; CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID/SEC ID Nº:	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
VEGFBII 111D05 **54**	EVQLVESGG GLVQTGGSLR LSCEASGRTF S	SYSM G	WFRQAPGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQI NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS
VEGFBII 111G06 **55**	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAASGRT FS	SYSM G	WFRQAPGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS
VEGFBII 112D11 **56**	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCEASGRT FS	SYSM G	WFRQAPGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQI NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS
VEGFBII 113A08 **57**	EVQLVESGG GLVQTGGSLR LSCEVSGRTF S	SYSM G	WFRQAPGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQI NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS

VEGFBII 113E03 **58**	EVQLVESGG GLVQTGDSLR LSCEVSGRTF S	SYSM G	WFRQAQGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS
VEGFBII 114C09 **59**	EVQLVESGG GLVQPGDSL RLSCEVSGRT FS	SYSM G	WFRQAPGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQI NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS
VEGFBII 114D02 **60**	EVQLVESGG GLVQTGGSLR LSCEVSGRTF S	SYSM G	WFRQAPGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQI NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS
VEGFBII114D 03 **61**	EVQLVESGG GLVQTGDSLR LSCAVSGRTF S	SYSM G	WFRQAQGKER EFVV	AISKGGYKY DSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQI NSLRPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTLVTV SS
VEGFBII118E 10 **62**	EVQLVESGG GLVQTGDSLR LSCEVSGRTF S	SYSM G	WFRQAQGKER EFVV	AISKGGYKY DAVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQI NSLKPEDTAVYYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQGTQVTV SS

562
278

Estas variantes se caracterizan como proteínas purificadas en el AlphaScreen VEGF165/VEGFR2 (Ejemplo 12.3, Figura 36). La temperatura de fusión (T_m) de cada clon se determinó en un ensayo de cambio térmico, que se basó en el aumento de la señal de fluorescencia tras la incorporación de Sypro Orange (Invitrogen) (Ericsson *et al*, Anal. Biochem. 357 (2006), págs. 289-298). Todas las variantes mostraron valores CI_{50} comparables cuando se compararon con VEGFBII23B04 y los valores T_m eran similares o superiores cuando se compararon con el VEGFBII23B04 parental. La Tabla 58 resume los valores CI_{50}, el % de inhibición y los valores T_m a pH 7 de los 9 clones ensayados.

Tabla 58: Valores CI_{50} (pM), % de inhibición y temperatura de fusión (pH 7) de las variantes de VEGFBII23B04 de secuencia optimizada.

VHH ID	CI_{50} (pM)	% inhibición	T_m pH 7 (°C)
VEGFBII23B04 (peso)	*169*	*100*	*63*
VEGFBII111D05	209	100	68
VEGFBII111G06	366	100	71
VEGFBII112D11	221	100	70
VEGFBII113A08	253	100	69
VEGFBII113E03	290	100	68
VEGFBII114C09	215	100	71
VEGFBII114D02	199	100	74
VEGFBII114D03	227	100	64
VEGFBII118E10	189	100	62

En un segundo ciclo, se combinaron mutaciones toleradas de intentos de humanización (VEGFBII111G06) y mutaciones para evitar la posible modificación post traduccional en los sitios seleccionados (sustitución en D16G, S60A y una mutación en E1D) dando como resultado un clon de secuencia optimizada derivado de VEGFBII23B04: VEGFBII0037. Se espera una variante extra de secuencia optimizada (VEGFBII038) que contenga todas las sustituciones como VEGFBII037, con la excepción de la mutación en 182M, ya que esta mutación puede asociarse con una menor caída de potencia. Las secuencias de ambos clones de secuencia optimizada se indican en la Tabla 59. VEGFBII037 y VEGFBII038 se caracterizaron en el AlphaScreen bloqueador para VEGF165/VEGFR2 (Ejemplo 13.3, Figura 37), la temperatura de fusión se determinó en el ensayo de cambio térmico como se ha descrito anteriormente y la afinidad para la unión en VEGF165 se determinó en Biacore (Ejemplo 13.5). En la Tabla 60 se presenta una visión de conjunto de las características de las dos secuencias optimizadas de VHH.

Tabla 59: Secuencias AA de las variantes de VEGFBII23B04 de secuencia optimizada

VHH ID/ SEC ID Nº:	**FR 1**	**CDR 1**	**FR2**	**CDR 2**	**FR3**	**CDR 3**	**FR 4**
VEGFBII 037 **63**	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRLS CAASG RTFS	SYSMG	WFRQA PGKER EFVV	AISKGGY KYDAVSL EG	RFTISRDNA KNTVYLQMN SLRPEDTAV YYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQ GTLV TVSS
VEGFBII 038 **64**	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRLS CAASG RTFS	SYSMG	WFRQA PGKER EFVV	AISKGGY KYDAVSL EG	RFTISRDNA KNTVYLQIN SLRPEDTAV YYCAS	SRAYGS SRLRLAD TYEY	WGQ GTLV TVSS

Tabla 60: Valores CI_{50} (pM), % de inhibición, temperatura de fusión (pH 7) y afinidad (pM) de clones VEGFBII037 y VEGFBII038 de secuencia optimizada

VHH ID	**CI_{50} (pM)**	**% inhibición**	**T_m (°C) pH 7**	**K_D (pM)**
VEGFBII23B04	*152*	*100*	*63*	*560*
VEGFBII037	300	100	72	270
VEGFBII038	143	100	71	360

15.2 Optimización de secuencia de VEGFBII5B05

La secuencia de aminoácidos de VEGFBII5B05 se alineó con la secuencia de la línea germinal humana VH3-23/JH5; véase la Figura 38 y la SEC ID Nº: 100. El alineamiento muestra que VEGFBII5B05 contiene 15 mutaciones en la región flanqueante con respecto a la secuencia de la línea germinal de referencia. Se seleccionaron restos no humanos en las posiciones 23, 60, 83, 105, 108 para la sustitución con sus homólogos de la línea germinal humana mientras que la histidina en la posición 44 se seleccionó para la sustitución por glutamina. Se construyó una variante por humanización que llevaba las 6 mutaciones descritas (en la Tabla 61 se indica la secuencia AA).

Tabla 61: Secuencia AA de variantes de VHH VEGFBII5B05 de secuencia

optimizada (FR, región flanqueante; CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID/ SEC ID Nº.:	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
VEGFBII 119G11 **65**	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGIRFM	SMA	WYRQAPG KQRELVA	RISSG GTTAY ADSVK G	RFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAED TAVYYCNT	FSSRP NP	WGQGTL VTVSS
VEGFBII 120E10 **66**	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCVA SGIRFI	SMA	WYRQAPG KHRELVA	RISSG GTTAY VDSVK G	RFTISRDN SKNTVYLQ MNSLKAED TAVYYCNT	FSSRP NP	WGAGTQ VTVSS

Se construyó una variante adicional en la que se eliminó el posible sitio de oxidación en la posición M30 (región CDR1, véase la Figura 38 indicada como resto en cursiva en negrita) introduciendo una mutación M30I. Ambas variantes se ensayaron para determinar su capacidad de unirse a hVEGF165 usando el ProteOn. En resumen, se revistió una microplaca detectora GLC ProteOn con VEGF165 humano. Se diluyeron extractos periplásmicos de las variantes a 1/10 y se inyectaron a través de la microplaca revestida con VEGF165 humano. Se calcularon las velocidades de disociación y se compararon con las velocidades de disociación de VEGFBII5B05 parental. Las velocidades de disociación de las 2 variantes están en el mismo intervalo que las velocidades de disociación del VEGFBII5B05 parental indicando que todas las mutaciones se toleraban (Tabla 62)

Tabla 62: Velocidades de disociación de variantes de VEGFBII5B05 de secuencia optimizada.

VHH ID	**Nivel de unión (RU)**	**k_d (1/s)**
VEGFBII5B05	*242*	*6,15E-02*
VEGFBII119G11	234	7,75E-02
VEGFBII120E10	257	4,68E-02

En un segundo ciclo, se combinaron mutaciones del intento de humanización y la sustitución de M30I dando como resultado un clon de secuencia

282

optimizada de VEGFBII5B05, denominado VEGFBII032. La secuencia se indica en la Tabla 63. La afinidad de VEGFBII032 se determinó por Biacore (véase el Ejemplo 12.5) y la temperatura de fusión se determinó en el ensayo de cambio térmico como se ha descrito anteriormente. En la Tabla 64 se presenta una visión de conjunto de las características del VHH VEGFBII032 de secuencia optimizada.

Tabla 63: Secuencia AA del clon VEGFBII032 de secuencia optimizada (FR, región flanqueante; CDR, región determinante de la complementariedad)

VHH ID/ SEC ID Nº.:	**FR1**	**CDR1**	**FR2**	**CDR2**	**FR3**	**CDR3**	**FR4**
VEGFBII 032 **67**	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAASGIRF I	SMA	WYRQAPG KQRELVA	RISSG GTTAY ADSVK G	RFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAE DTAVYYC NT	FSSRPNP	WGQGTL VTVSS

Tabla 64: Temperatura de fusión (pH 7) y afinidad (nM) del clon VEGFBII032 de secuencia optimizada

VHH ID	**T_m (°C) pH 7**	**K_D (nM)**
VEGFBII5B05 (peso)	*69*	*32*
VEGFBII0032	71	44

La potencia de los clones de secuencia optimizada VEGFBII037 y VEGFBII038 se evaluó en un ensayo de proliferación. En resumen, células HUVEC primarias (Technoclone) se privaron de complemento durante una noche y después 4.000 células/por pocillo por cuadruplicado se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Las células se estimularon en ausencia o presencia de los VHH con 30 ng/ml de VEGF. Las tasas de proliferación se midieron incorporando [^{3}H] Timidina el día 4. Los resultados mostrados en la Tabla 65 demuestran que la actividad (potencia y grado de inhibición) del VHH parental VEGFBII23B04 se conserva en el clon VEGFBII038 de secuencia optimizada.

Tabla 65: Valores CI50 (nM) y % de inhibición de los clones VEGFBII037 y VEGFBII038 de secuencia optimizada en un ensayo de proliferación HUVEC para VEGF

VHH ID	CI_{50} (nM)	% inhibición
VEGFBII23B04	0,68	92
VEGFBII037	1,54	78
VEGFBII038	0,60	92
Bevacizumab	0,29	94

Ejemplo 16

Construcción y caracterización de los VHH biespecíficos dirigiendo VEGF y DII4 usando PEGilación o unión de albúmina anti-suero como ampliación de la semi vida

En un primer ciclo, se usaron VEGFBII23B04 y DIIBII101G08 como bloques de construcción para generar los VHH biespecíficos VEGFDIIBII001-006. Se aplicaron dos metodologías de ampliación de semivida: i) PEGilación o ii) fusión genética a un VHH de unión a albúmina de suero. Los bloques de construcción se unieron mediante un enlazador flexible 9 Cly-Ser, 35 Gly-Ser o 35 Gly-Ser (Cys en la posición 15). En la Tabla 66-A, SEC ID Nº: 68-73 y en la Figura 39, se representa una visión global del formato y la secuencia de los 6 VHH biespecíficos (se subrayan las secuencias enlazadoras).

Tabla 66-A: Secuencias de los VHH biespecíficos dirigiendo VEGF y DII4

VHH ID/ SEC ID Nº:	Secuencia AA
VEGFDIIBII001 **68**	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGT AYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGR FTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFDIIBII002 **69**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYK YDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQG RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSS

284

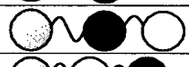
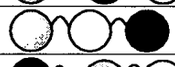
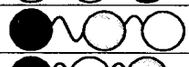
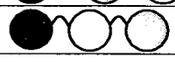
VEGFDIIBII003 **70**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYK YDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAG GSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
VEGFDIIBII004 **71**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYK YDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS SYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWGQGTQVTVSS
VEGFDIIBII005 **72**	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGT AYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTG DSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDN AKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
VEGFDIIBII006 **73**	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGT AYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAADTRLGPYEYDYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFS SYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPED TAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS

Para explorar las propiedades bloqueadoras anti-VEGF en comparación con el bloque de construcción monovalente VEGFBII23B04, se analizaron los seis VHH en el AlphaScreen de competencia para VEGF/VEGFR2-Fc (Ejemplo 12.3; Figura 41) y VEGF/VEGFR1-Fc (Ejemplo 12.4; Figura 42). Estos 2 ensayos de competencia también se realizaron después de la preincubación de los VHH con 5 μM de albúmina de suero humano. En la Tabla 66-B se muestra un resumen de los valores CI_{50}.

Tabla 66-B: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición en el AlphaScreen de competencia para VEGF/VEGFR1 y VEGF/VEGFR2 (para una descripción del formato VHH,

285
7-69

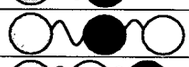
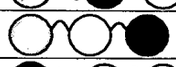
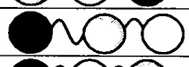
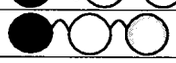
véase la Figura 39)

		VEGFR1				VEGFR2			
VHH ID	**Formato**	**- HSA**		**+ HSA**		**- HSA**		**+ HSA**	
		CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh
VEGFBII23B04		0,45	48	n/d	n/d	0,22	100	0,30	100
VEGFDIIBII001		1,58	69	n/d	n/d	0,64	100	0,64	100
VEGFDIIBII002		0,36	64	n/d	n/d	0,20	100	0,24	100
VEGFDIIBII003		0,37	57	1,63	66	0,20	100	0,77	100
VEGFDIIBII004		0,47	57	0,56	70	0,20	100	0,37	100
VEGFDIIBII005		1,44	62	1,82	75	0,84	100	1,42	100
VEGFDIIBII006		2,07	67	2,41	75	1,16	100	2,22	100
Ranibizumab		5,88	70	n/d	n/d	0,90	100	n/d	n/d

n/d, no determinado

Para explorar las propiedades bloqueadoras anti-Dll4 en comparación con el bloque de construcción monovalente DIIBII101G08, se ensayaron los seis VHH en el ensayo FMAT de competencia para CHO-hDll4/hNotch1-Fc (Ejemplo 4; Figura 43). Este ensayo también se realizó después de la preincubación de los VHH con 25 µM de albumina de suero humana. En la Tabla 67 se observa un resumen de los valores CI_{50}.

Tabla 67: Valores CI_{50} (nM) en FMAT de competencia para CHO-hDll4. Para una descripción del formato VHH, véase la Figura 39.

		CI_{50} (nM) **CHO-hDll4**	
VHH ID	**Formato**	**- HSA**	**+ HSA**
DIIBII101G08		31,0	30,1
VEGFDIIBII001		128,5	121,6
VEGFIIBII002		105,9	119,9
VEGFDIIBII003		61,8	45,1
VEGFDIIBII004		43,0	23,1
VEGFDIIBII005		181,2	60,7
VEGFDIIBII006		54,9	47,6
Dll4 Fab		2,0	n/d

n/d, no determinado

En un segundo ciclo, se construyeron siete VHH biespecíficos de dirección a VEGF y Dll4 (VEGFDIIBII010, VEGFDIIBII011, VEGFDIIBII012, VEGFDIIBII013, VEGFDIIBII014, VEGFDIIBII015, VEGFDIIBII016). En estas construcciones, se

incluyeron los VHH madurados por afinidad DIIBII101G08 DIIBII129B05 o el VHH madurado por afinidad DIIBII115A05 DIIBII136C07. Adicionalmente, se incluyeron en 2 construcciones el VHH anti-VEGF bivalente que comprendía VEGFBII23B04 y VEGFBII5B05. Se aplicaron dos metodologías de ampliación de la semivida: i) PEGilación o ii) fusión genética a un VHH de unión albúmina de suero. Los bloques de construcción se unieron mediante un enlazador flexible 9 Gly-Ser, 35 Gly-Ser o 35 Gly-Ser (Cys en la posición 15). Una visión del conjunto del formato y de la secuencia de los siete VHH biespecíficos se representa en la Tabla 68-A (las secuencias enlazadoras se indican subrayadas), SEC ID Nos: 74-80 y Figura 40.

Para explorar las propiedades bloqueadoras anti-VEGF en comparación con el bloque de construcción monovalente VEGFBII23B04, se caracterizaron los siete VHH en el AlphaScreen de competencia para VEGF/VEGFR2-Fc (Ejemplo 12.3; Figura 44) y VEGF/VEGFR1-Fc (Ejemplo 12.4; Figura 45). Estos 2 ensayos de competencia también se realizaron después de la preincubación de los VHH con 5 μM de albúmina de suero humana. En la Tabla 68-B se muestra un resumen de los valores CI_{50}.

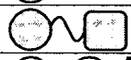
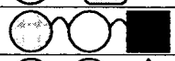
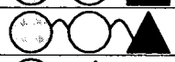
Tabla 68-A: Secuencias de los VHH biespecíficos que dirigen VEGF y DII4

VHH ID/ SEC ID Nº.:	**Secuencia AA**
VEGFDIIBII010 **74**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQA PGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPED TAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSS
VEGFDIIBII011 **75**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYDMSWVRRS PGKGPEWVSSINSGGGSTYYADYVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPED TAVYYCAADRYIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTQVTVSS

287

VEGFDIIBII012 **76**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYDMSW VRRSPGKGPEWVSSINSGGGSTYYADYVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL KPEDTAVYYCAADRYIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTQVTVSS
VEGFDIIBII013 **77**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAW YRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSS
VEGFDIIBII014 **78**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCVASGIRFMSMAWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRF TISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSSGG GGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYAD SVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDH WGQGTQVTVSS
VEGFDIIBII015 **79**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFMSMAWYR QAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAED TAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAM AWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSS
VEGFDIIBII016 **80**	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAY GSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAW YRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVTVSS

Tabal 68-B: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición en AlphaScreen de competencia para VEGF/VEGFR1 y VEGF/VEGFR2 (véase la Figura 40 para la descripción del formato VHH, las secuencias enlazadoras se subrayan) SEC ID Nº: 74 - 80

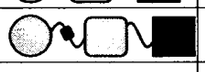
		VEGFR1				VEGFR2			
		- HSA		+ HSA		- HSA		+ HSA	
VHH ID	**Formato**	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh
VEGFBII23B04		0,43	44	n/d	n/d	0,19	100	0,20	100
VEGFBII022		n/d	n/d	n/d	n/d	0,017	100	n/d	n/d
VEGFDIIBII010		0,27	49	0,61	64	0,12	100	0,21	100
VEGFDIIBII011		0,60	65	0,36	68	0,17	100	0,25	100
VEGFDIIBII012		0,27	60	n/d	n/d	0,19	100	0,22	100
VEGFDIIBII013		0,24	62	n/d	n/d	0,18	100	0,17	100
VEGFDIIBII014		0,080	94	n/d	n/d	0,026	100	0,024	100
VEGFDIIBII015		0,040	96	n/d	n/d	0,016	100	0,015	100
VEGFDIIBII016		0,32	59	0,85	65	0,16	100	0,47	100
Ranibizumab		0,43	n/d	n/d	n/d	0,19	100	0,20	100

n/d, no determinado

Para explorar las propiedades bloqueadoras anti-DII4 en comparación con los bloques de construcción monovalentes madurados por afinidad DIIBII129B05 y DIIBII136C07, los siete VHH se evaluaron en el ensayo FMAT de competencia para CHO-hDII4/hNotch1-Fc y CHO-mDII4/hNotch1-Fc (Ejemplo 4; Figura 46) y el ensayo indicador mediado por DII4 (Ejemplo 12.5; Figura 47). Estos ensayos también se realizaron después de la preincubación de los VHH con 25 μM (ensayo FMAT) o 175 μM (ensayo indicador) de albúmina de suero humana. En la Tabla 69 se muestra un resumen de los valores CI_{50}.

Tabla 69: Valores de CI_{50} (nM) en ensayo indicador mediado por DII4 y FMAT de competencia para CHO-hDII4/CHO-mDII4 (véase la Figura 40 para una descripción del formato VHH). (*, sin curva de respuesta a dosis completa)

		CHO-hDII4				CHO-mDII4				indicador
VHH ID	Formato	- HSA		+ HSA		- HSA		+ HSA		+ HSA
		CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	
DIIBII129B05		3,2	90	4,3	90	3,0	100	3,7	100	88,0
DIIBII136C07		6,8	94	7,1	94	16,4	100	17,6	100	103,0
VEGFDIIBII010		4,9	90	5,3	100	5,4	95	3,9	100	209,1

VEGFDIIBII011		12,6	83	11,4	100	24,1	*	33,9	100	589,9
VEGFDIIBII012		44,9	100	41,5	100	95,3	100	102,7	100	582,2
VEGFDIIBII013		12,2	100	12,4	100	19,3	100	23,8	100	98,5
VEGFDIIBII014		9,9	100	12,3	100	15,4	100	15,4	100	122,5
VEGFDIIBII015		9,5	100	10,0	100	12,2	100	11,2	100	134,3
VEGFDIIBII016		5,2	90	5,8	100	4,5	95	4,9	100	257,7
Fab DII4		2,4	100	2,1	100	1,0	100	1,1	100	16,4

Finalmente, en un tercer ciclo, se construyeron los VHH biespecíficos A1, A2, A3 y HSA1-6. Se usaron los siguientes bloques de construcción para generar estas construcciones: VEGFBII038 (variante de secuencia optimizada de VEGFBII23B04), VEGFBII032 (variante de secuencia optimizada de VEGFBII5B05), DIIBII018 (variante de secuencia optimizada de DIIBII129B05) y DIIBII039 (variante de secuencia optimizada de DIIBII136C7). Se aplicaron tres metodologías de ampliación de la semivida: i) PEGilación, ii) fusión genética a un VHH de unión albúmina de suero y iii) fusión genética a albúmina de suero humana. Los bloques de construcción se unieron mediante un enlazador flexible 9 Gly-Ser, 35 Gly-Ser o 35 Gly-Ser (Cys en la posición 15). La Tabla 70-A representa una visión de conjunto del formato y secuencia de los tres VHH biespecíficos, SEC ID Nos: 81-89 y en la Figura 48.

Para explorar las propiedades bloqueadoras anti-VEGF en comparación con el bloque de construcción monovalente de secuencia optimizada VEGFBII038 o bloque de construcción biparatópico de secuencia optimizada VEGFBII022, los siete VHH se caracterizaron en el AlphaScreen de competencia para VEGF/VEGFR2-Fc (Ejemplo 12.3; Figura 49) y VEGF/VEGFR1-Fc (Ejemplo 12.4; Figura 50). Estos dos ensayos de competencia también se realizaron después de la preincubación de los VHH con 5 μM de albúmina de suero humana. En la Tabla 70-B se muestra un resumen de los valores CI_{50}.

Tabla 70-A: Secuencia de los VHH biespecíficos que dirigen VEGF y DII4

VHH ID/SEC ID Nº:	**Secuencia AA**
A1/**81**	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKER EFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVY YCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYD HWGQGTLVTVSS
A2/**82**	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKER EFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVY YCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYA DSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAP YEYDHWGQGTLVTVSS
A3/**83**	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKER EFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVY YCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVARISSGGTTAYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAI RWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA NRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSS

HSA1/**84**	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKE REFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAV YYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEY DHWGQGTLVTVSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQ CPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVAR LSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES KDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEK CCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQN ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAED YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYV PKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

HSA2/**85**	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKE REFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAV YYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVAR ISSGGTTAYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNT FSSRPNPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVT EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAK QEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELR DEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVST PTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK TPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

293 292

HSA3/**86**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIGSYDMSWVRRAPGKGP EWVSSISSGGGSTYYADYVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDT AVYYCAADRYIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYD AVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRL RLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVARISSGGTTAYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGQGTLV TVSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFA EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK DVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK CCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

HSA4/**87**	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKE REFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAV YYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGRTFSSYAMAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEY DHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEM ADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE TFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPH ECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKK VPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

2-9-02

HSA5/**88**	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKE REFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAV YYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVAR ISSGGTTAYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNT FSSRPNPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MAWYRQAPGKEREYVAAIRWSGGTAYYADSVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLRPEDTAVYYCANRAPDTRLAPYEYDHWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEV AHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCV ADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHP YFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSA KQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRV TKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKET CFAEEGKKLVAASQAALGL

HSA6/**89**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIGSYDMSWVRRAPGKGP EWVSSISSGGGSTYYADYVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDT AVYYCAADRYIWARQGEYWGAYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYD AVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRL RLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGIRFISMAWYRQAPGKQRELVARISSGGTTAYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTFSSRPNPWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP ERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIA RRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGK ASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT DLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTL VEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPV SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL SEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKAD DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

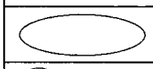
Tabla 70-B: Valores CI_{50} (nM) y % inhibición en AlphaScreen de competencia para VEGF/VEGFR1 y VEGF/VEGFR2 (véase la Figura 48 para una descripción del formato VHH). Todas las moléculas mostraron una inhibición del 100% en el ensayo AlphaScreen para VEGF/VEGFR2.

		VEGFR1				**VEGFR2**			
		- HSA		**+ HSA**		**- HSA**		**+ HSA**	
VHH ID	**Formato**	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh
VEGFBII038		0,2	50	n/d	n/d	0,2	100	0,1	100
VEGFBII022		0,07	87	n/d	n/d	0,05	100	0,03	100
A1		0,1	80	n/d	n/d	0,07	100	n/d	n/d

A2		0,3	71	0,3	63	0,2	100	0,2	100
A3		0,02	97	n/d	n/d	0,01	100	n/d	n/d
HSA1		0,7	63	n/d	n/d	0,4	100	n/d	n/d
HSA2		0,09	93	n/d	n/d	0,01	100	n/d	n/d
HSA3		0,1	93	n/d	n/d	0,01	100	n/d	n/d
HSA4		0,5	66	n/d	n/d	0,3	100	n/d	n/d

n/d, no determinado

Leyenda:

Nanocuerpo, enlazador o HSA	**descripción**
	DIIBII018
	DIIBII039
	VEGFBII038
	VEGFBII032
	HSA
	ALB8
	*enlazador 9gs*
	*enlazador 35gs*
	*enlazador* PEGilado *35gs,cys15*

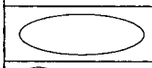
Para explorar las propiedades bloqueadoras anti-Dll4 en comparación con los bloques de construcción monovalentes de secuencia optimizada DLLBII018 y DLLBII039, los siete VHH se evaluaron en el ensayo FMAT de competencia para CHO-hDll4/hNotch1-Fc y CHO-mDll4/hNotch1-Fc (Ejemplo 4; Figura 51). Estos ensayos también se realizaron después de la preincubación de los VHH con 25 μM (ensayo FMAT) de albúmina de suero humana. En la Tabla 71 se muestra un resumen de los valores CI_{50}.

Tabla 71: Valores CI_{50} (nM) en FMAT de competencia para CHO-hDll4/CHO-mDll4 y ensayo indicador mediado por Dll4 (véase la Tabla 70-A, Figura 48 y las SEC ID Nos: 81 - 89 para una descripción del formato).

		CHO-hDll4				CHO-mDll4			
		- HSA		+ HSA		- HSA		+ HSA	
VHH ID	Formato	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh	CI_{50} (nM)	% inh
DIIBII018		5,5	87	7,1	100	2,4	99	2,8	100
DIIBII039		3,6	102	n/d	n/d	6,7	100	n/d	n/d
A1		6,7	102	n/d	n/d	3,4	100	n/d	n/d
A2		9,9	73	17,9	100	5,2	91	5,7	100
A3		16,1	97	n/d	n/d	7,9	95	n/d	n/d
HSA1		8,1	96	n/d	n/d	4,8	100	n/d	n/d
HSA2		17,3	87	n/d	n/d	7,4	100	n/d	n/d
HSA3		11,5	100	n/d	n/d	28,7	100	n/d	n/d
HSA4		9,3	93	n/d	n/d	5,3	100	n/d	n/d
Dll4 Fab		7,7	100	7,5	100	1,9	100	2,4	100

n/d, no determinado

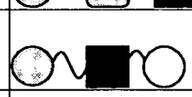
Leyenda:

Nanocuerpo, enlazador o HSA	**descripción**
	DIIBII018
	DIIBII039
	VEGFBII038
	VEGFBII032
	HSA
	ALB8
	*enlazador 9gs*
	*enlazador 35gs*
	*enlazador* PEGilado *35gs,cys15*

La potencia de los VHH biespecíficos se evaluó en el ensayo de

proliferación VEGF. En resumen, células HUVEC primarias (Technoclone) se privaron de complemento durante una noche y después 4.000 células/por pocillo se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos por cuadruplicado. Las células se estimularon en ausencia o presencia de VHH con 35 ng/ml de VEGF. Este ensayo se realizó después de la preincubación de los VHH con albúmina de suero humana 520 nM como se ha indicado. Las tasas de proliferación se midieron incorporando [^{3}H] Timidina el día 4. Los resultados mostrados en la Tabla 72 demuestran que los VHH biespecíficos y Bevacizumab inhiben la proliferación de HUVEC inducida por VEGF en más del 90% con valores CI_{50} < 1nM.

Tabla 72: Valores CI_{50} (nM) y % inhibición de los VHH biespecíficos en ensayo de proliferación HUVEC para VEGF

		- HSA		**+ HSA**	
VHH ID	**Formato**	CI_{50} (nM)	% inhibición	CI_{50} (nM)	% inhibición
VEGFBII23B04		0,78	87	0,69	95
VEGFDIIBII010		n/d	n/d	0,60	94
VEGFDIIBII013		0,73	92	n/d	n/d
VEGFDIIBII014		0,49	98	n/d	n/d
VEGFDIIBII015		0,49	109	n/d	n/d
VEGFDIIBII016		n/d	n/d	0,72	95
Bevacizumab		0,22	92	0,26	96

Leyenda:

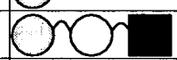
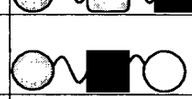
Nanocuerpo o enlazador	**descripción**
	DIIBII129B05
	VEGFBII23B04
	5B05
	ALB8
	*enlazador 9gs*
	*enlazador 35gs*
	*enlazador* PEGilado *35gs,cys15*

n/d, no determinado

La potencia de los VHH biespecíficos se midió en el ensayo de fosforilación de Erk en HUVEC para VEGF. En resumen, células HUVEC primarias se privaron

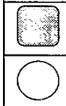
de suero durante una noche y después se estimularon en ausencia o presencia de los VHH con 10 ng/ml de VEGF durante 5 minutos. Este ensayo se realizó después de la preincubación de los VHH con albumina de suero humana 250 nM como se ha indicado. Las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y los niveles de fosforilación de ERK se midieron por ELISA usando anticuerpos específicos fosfoERK (anti-fosfoMAP quinasa pERK1y2, M8159, Sigma) y conjugado de inmunoglobulina policlonal de conejo anti-ratón con HRP (PO161, Dako). Como se muestra en la Tabla 73, los VHH biespecíficos y de Bevacizumab inhiben el VEGF inducido por fosforilación de Erk en más del 90% con valores CI_{50} < 1nM.

Tabla 73: Valores CI_{50} (nM) y % de inhibición de los VHH biespecíficos en el ensayo de fosforilización de Erk en HUVEC para VEGF

		- HSA		+ HSA	
VHH ID	**Formato**	CI_{50} (nM)	% Inhibición	CI_{50} (nM)	% inhibición
VEGFBII23B04		0,69	91	0,60	93
VEGFDIIBII010		n/d	n/d	0,74	94
VEGFDIIBII013		0,89	95	n/d	n/d
VEGFDIIBII014		0,53	101	n/d	n/d
VEGFDIIBII015		0,40	106	n/d	n/d
VEGFDIIBII016		n/d	n/d	1,03	93
Bevacizumab		0,68	99	0,83	98

n/d, no determinado

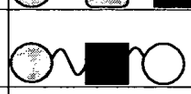
Leyenda:

Nanocuerpo o enlazador	**descripción**
	DIIBII129B05
	VEGFBII23B04
	5B05
	ALB8
	*enlazador 9gs*
	*enlazador 35gs*
	*enlazador* PEGilado *35gs,cys15*

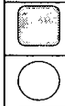
La potencia de los VHH biespecificos se evaluó en el ensayo de proliferación HUVEC de DII4 como describen Ridgway *et al.*, Nature. 21 de diciembre de 2006; 444 (7122):1083-7, en forma modificada. En resumen, se

revistieron placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con DII4-His purificado (RnD Systems; DII4 humano marcado con His en C-terminal, 27-524 aminoácidos, 0,75 ml/pocillo, 10 ng/ml) en tampón de recubrimiento (PBS, BSA al 0,1%). Los pocillos se lavaron en PBS antes de sembrar 4.000 células HUVEC/ pocillo por cuadruplicado. Este ensayo se realizó después de la preincubación de los VHH con 50 μM de albúmina de suero humana, como se ha indicado. La proliferación celular se midió incorporando [^{3}H]-Timidina el día 4. En la Tabla 74 se resumen los valores CI_{50} de los VHH biespecíficos y de Fab DII4.

Tabla 74: Valores CI_{50} (nM) e inhibición de los VHH biespecíficos en el ensayo de proliferación HUVEC mediado por DII4

		- HSA		+ HSA	
VHH ID	**Formato**	CI_{50} (nM)	inhibición	CI_{50} (nM)	inhibición
VEGFBII129B05		2,32	completa	3,52	completa
VEGFDIIBII010		n/d	completa	3,39	completa
VEGFDIIBII013		2,06	completa	n/d	completa
VEGFDIIBII014		0,53	completa	n/d	completa
VEGFDIIBII015		0,28	completa	n/d	completa
VEGFDIIBII016		n/d	completa	35,22	completa
Fab DII4		7,85	completa	2,79	completa

Leyenda:

Nanocuerpo, o enlazador	**descripción**
	DIIBII129B05
	VEGFBII23B04
	5B05
	ALB8
	*enlazador 9gs*
	*enlazador 35gs*
	*enlazador* PEGilado *35gs,cys15*

Ejemplo 17:

Eficacia de las moléculas de unión seleccionadas en un modelo de ratón de cáncer de colon humano

La eficacia de los tres VHH seleccionados VEGFDIIBII010, VEGFDIIBII013 y

VEGFDIIBII015 se ensayó en un modelo de ratón de cáncer de colon humano (línea celular SW620) en ratones desnudos.

Se obtuvieron células SW620 de ATCC (CCL-227). Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejido T175 a 37ºC y CO_2 al 0%. El medio usado es Medio L-15 de Leibovitz (Gibco Cat. 11415) y suero de ternero fetal al 10% (JRH Cat. 12103-1.000 ml). Los cultivos se fragmentaron hasta subconfluencia con una proporción de fragmentación de 1:10 o 1:20. Los ratones eran hembras atímicas de 7 semanas de edad BomTac:NMRI-*Foxn1*^{nu} , adquiridas en Taconic, Dinamarca. Para establecer tumores subcutáneos, las células SW620 se tripsinizaron, se lavaron, se resuspendieron en PBS + FCS al 5% a $5x10^7$/ml. Después se inyectó una suspensión celular de 100 µl que contenía $5x10^6$ células por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones (un sitio por ratón). Cuando los tumores estaban bien establecidos y habían alcanzado volúmenes de 47 a 93 mm^3 (10 días después de la inyección de las células), los ratones se distribuyeron al azar entre los grupos de tratamiento y el control de vehículo.

Los VHH se diluyen con PBS.

Las dosis se calcularon para dosis equivalentes de Avastatina (bevacizumab) de 7,5 mg/kg, 2,5 mg/kg y 15 mg/kg respectivamente (Tabla 75). Todas las dosis se calcularon de acuerdo con peso corporal promedio de todos los ratones el día 0 (27,7 g) y se administraron en un volumen de 100 µl por ratón. Los VHH se administraron diariamente o cada dos días por vía intraperitoneal. El día 1 es el primero y el día 21 el último día del tratamiento.

Los diámetros tumorales se midieron tres veces a la semana (lunes, miércoles y viernes) con un compás de calibre. El volumen de cada tumor [en mm^3] se calculó de acuerdo con la fórmula "volumen tumoral = a longitud * diametro^{2*} π/6". Para controlar los efectos secundarios del tratamiento, los ratones se inspeccionaron diariamente para detectar anomalías y el peso corporal se determinó tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Los animales se sacrificaron cuando los tumores de control alcanzaron un tamaño de aproximadamente 1.000 mm^3 de promedio.

La evaluación estadística se realizó para el volumen de los parámetros volumen tumoral y peso corporal al final del experimento el día 21. Para los valores absolutos del volumen tumoral y para el peso corporal se usó el porcentaje de cambio con respecto al peso inicial el día. Debido a la variación observada, se aplicaron métodos no paramétricos.

Para estimaciones descriptivas se calculó el número de observaciones, la media, mínima y máxima. Para una revisión rápida de posibles efectos de tratamiento, la media del volumen tumoral de cada grupo de tratamiento T se refiere a la media del control C.

- volumen de tumor relativo (T/C)

$$T/C = 100 * \frac{T_d}{C_d}$$

- inhibición del crecimiento tumoral (TGI) desde el día 1 hasta día *d*

$$TGI = 100 * \frac{(C_d - C_1) - (T_d - T_1)}{(C_d - C_1)}$$

en la que C_1, T_1 = volúmenes medios tumorales en el grupo de control y de tratamiento al principio del experimento el día 1,

C_d, T_d = volúmenes medios tumorales en el grupo de control y de tratamiento al final del experimento el día *d*

Se aplicó un ensayo Wilcoxon de disminución unilateral para comparar los grupos de dosificación de los tres VHH con el control, examinando una reducción del volumen tumoral como efecto y una reducción de la ganancia de peso corporal como evento adverso.

Los valores p para el volumen tumoral (parámetro de eficacia) se ajustaron para comparaciones múltiples de acuerdo con Bonferroni-Holm, mientras que los valores p del peso corporal (parámetro de tolerabilidad) permanecieron sin ajustar para no pasar por alto un posible efecto adverso.

El nivel de significación se fijó a α= 5%. Un valor p (ajustado) menor de 0,05 se considera que muestra una diferencia entre los grupos de tratamiento; las diferencias observan como indicativas siempre que 0,05 ≤ p-valor < 0,10.

La evaluación estadística se preparó usando la versión 9.2 de SAS del paquete informático (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) y Proc StatXact (Cytel Software Corporation, Cambridge MA, USA).

Como se muestra en la Figura 52 y en la Tabla 75 y 76, VEGFDIIBII013, VEGFDIIBII010 y VEGFDIIBII015 muestran eficacia significativa en el modelo de cáncer de colon SW620 y se toleran bien.

La Figura 52A muestra la cinética de crecimiento tumoral de SW620: ratones portadores de tumor SW620 se tratan diariamente (símbolos abiertos) con VEGFDIIBII013 (VHH 1), VEGFDIIBII010 (VHH 2) o VEGFDIIBII015 (VHH 3) o cada

segundo día (símbolos cerrados) con VEGFDIIBII013 (VHH 1) o VEGFDIIBII010 (VHH 2). Las media de los volúmenes tumorales se representan a lo largo del tiempo. El día 1 es el primer día, el día 21 el último día del experimento. Los triángulos en la parte superior del gráfico indican los días de tratamiento.

La Figura 52B muestra los volúmenes tumorales absolutos al final del estudio el día 21: los ratones portadores de tumor SW620 se trataron diariamente (símbolos abiertos) con VEGFDIIBII013 (VHH 1), VEGFDIIBII010 (VHH 2) o VEGFDIIBII015 (VHH 3) o cada dos días (símbolos cerrados) con VEGFDIIBII013 (VHH 1) o VEGFDIIBII010 (VHH 2). Se representan los volúmenes tumorales absolutos individuales el día 21. Cada símbolo representa un tumor individual. Las líneas horizontales representan la media de los volúmenes tumorales.

La Figura 52C muestra el cambio de peso corporal a lo largo del tiempo; los ratones portadores de tumores SW620 se trataron diariamente (símbolos abiertos) con VEGFDIIBII013 (VHH 1), VEGFDIIBII010 (VHH 2) o VEGFDIIBII015 (VHH 3) o cada dos días (símbolos cerrados) con VEGFDIIBII013 (VHH 1) o VEGFDIIBII010 (VHH 2). El día 1 es el primer día, el día 21 es el último día del tratamiento. Los triángulos en la parte superior del gráfico indican los días de tratamiento.

Tabla 75: Volumen tumoral: tratamiento frente a control (resultados el día 21)

Compuesto	Dosis [mg/kg]	Programa	TGI [%]	Valor p
Vehículo	-	qdx21	-	-
VEGFDIIBII013	7	qdx21	92,2	0,0004
	2,33	qdx21	87,6	0,0004
	14	q2dx11	93,1	0,0004
VEGFDIIBII010	4,05	qdx21	97,1	0,0004
	1,35	qdx21	93,4	0,0004
	8,1	q2dx11	94,9	0,0004
VEGFDIIBII015	8,43	qdx21	91,6	0,0004
	2,81	qdx21	90,1	0,0004

Tabla 76: Peso corporal: tratamiento frente a control (resultados el día 21)

Compuesto	Dosis [mg/kg]	Programa	TGI [%]	Valor p
Vehículo	-	qdx21	8,85	-
VEGFDIIBII013	7	qdx21	7,97	0,3177
	2,33	qdx21	8,63	0,3698
	14	q2dx11	8,15	0,2681
VEGFDIIBII010	4,05	qdx21	6,61	0,3004
	1,35	qdx21	9,05	0,4811
	8,1	q2dx11	9,50	0,5937
VEGFDIIBII015	8,43	qdx21	10,9	0,6655
	2,81	qdx21	6,56	0,6655

Ejemplo 18

Farmacocinética de los VHH formateados en ratones

Para determinar la farmacocinética de los VHH seleccionados en ratones, se administró una sola dosis de 33 nmol/kg en 0,1 ml i.p. a ratones hembra BomTac:NMRI-Foxn1nu (6-7 semanas de edad), seis animales/grupo. A diferentes momentos (3 ratones por momento) se obtuvieron aproximadamente 50 µl de sangre por hemorragia retroorbital con anestesia usando isoflurano. Las muestras se centrifugaron después de 30 minutos y los 20 µl de suero obtenidos se almacenaron a -20ºC hasta el análisis. Las concentraciones de VHH se midieron mediante ELISA de tipo sándwich.

Se revistieron placas de microtitulación (Medisorc Nunc) con 100 µl por pocillo de VEGF humano (R&D Systems 293-VE/CF) diluido a 0,5 µg/ml en tampón carbonato pH 9,6 durante una noche a +4ºC. Después de lavar con 300 µl de agua desionizada, los sitios de unión residuales se bloquearon por la adición de 200 µl de tampón bloqueante (PBS/ albúmina de suero bovino al 0,5%/Tween 20 al 0,05 %) durante 0,5 horas.

Después de una etapa de lavado adicional, se añadieron 100 µl por pocillo de diluciones de muestras convencionales o medio de dilución de suero (SDM, tampón bloqueante + grupo de suero de ratón al 2% PAA Labor GmbH) a las placas ELISA y se incubaron en un agitador de placa durante una hora a temperatura ambiente. Para generar la curva convencional, los VHH se diluyeron a 100 (VEGFDIIBII013) o 10 (VEGFDIIBII010 y VEGFDIIBII015) ng/ml en medio de dilución de suero y se añadió a las placas ELISA en 8 diluciones dobles en SDM por duplicado. Las muestras de suero de ratón se diluyeron en un mínimo de 1:50 en tampón bloqueante y se realizaron diluciones adicionales en SDM. Se añadieron muestras de suero a las placas ELISA también en 8 diluciones dobles y por duplicado.

Las placas se lavaron una vez más y para la detección de los VHH unidos se añadieron 100 µl por pocillo de Dll4humano-HIS (R&D Systems 1506-D4/CF) diluido a 0,2 µl/ml en tampón de bloqueo y se incubaron en el agitador durante 1 hora como se ha indicado anteriormente. Después de lavar las placas de nuevo se añadieron 100 µl por pocillo de anti-6XpoliHistidina-HRPO (R&D Systems MAB050H) diluido a 1:5000 en tampón de bloqueo y las placas se incubaron durante 1 hora como se ha indicado anteriormente. Después de un triple lavado final con 300 µl de agua desionizada cada VHH unido se detectó por adición de 100

µl por pocillo de solución de tinción TMB (Bender MedSystems BMS406.1000) y se detuvo el desarrollo del color después de aproximadamente 10 minutos de incubación a temperatura ambiente en el agitador añadiendo 100 µl por pocillo de ácido fosfórico 1 M. Las densidades ópticas de los pocillos individuales se cuantificaron usando un espectrofotómetro de placa de microtitulación (ThermoMax, Molecularr Devices) y el programa informático ELISA SoftMax Pro (Molecular Devices). Los resultados de las muestras derivan de curvas convencionales ajustadas usando un ajuste de acuerdo logístico de cuatro parámetros.

Tabla 77:

	Concentración en suero de VHH (nM)		
tiempo (h)	VEGFDIIBII013	VEGFDIIBII010	VEGFDIIBII015
0,0833	2,49	4,85	0,88
0,5	69,8	60,5	40,7
1	230	264	113
4	376	335	308
24	151	184	160
72	15,2	48,7	26,8
168	< 0,86	0,88	1,71
240	< 0,78	< 0,14	< 0,21

Se determinó que las semividas en suero de los VHH eran de 15 horas (VEGFDLLBII013), 17 horas (VEGFDIIBII010) y 24 horas (VEGFDIIBII015), respectivamente. (La determinación de la semivida se realizó ajustando los 3 últimos puntos de datos de las curvas de concentración plasmática media con WinNonLin V6 frente a una pendiente exponencial).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión bioespecífica que comprende un componente de unión a DII4 y un componente de unión a VEGF.

2. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 1, en el que dicho componente de unión a DII4 y dicho componente de unión a VEGF comprende al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a DII4 y al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF, respectivamente.

3. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 2, en la que dichos dominios variables sencillos de inmunoglobulina son los VHH.

4. Una moléculaa de unión biespecífica de la reivindicación 2 ó 3, en la que dicho componente de unión a VEGF se localiza en el extremo N.

5. Una molécula de unión biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que dicho componente de unión a DII4 y dicho componente de unión a VEGF comprende al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF y al menos un domino variable sencillo de inmunoglobulina de unión a DII4, respectivamente, en el que dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina tiene cuatro regiones flanqueantes y tres regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en las que

a) una CDR de dicho al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a DII4 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de

i. Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Xaa Pro Tyr Xaa Tyr Asp
Xaa se muestra la SEC ID Nº: 1, en la que
Xaa en la posición 8 es Arg, Ala o Glu;
Xaa en la posición 11 es Leu o Glu; y
Xaa en la posición 14 es Tyr o His; y

ii. Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
Tyr Xaa AspTyr como se muestra en la SEC ID Nº: 2, en la

que

Xaa es Gln, Ala o Tyr; y en la que

b) una CDR de dicho dominio al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF tiene la secuencia de aminoácidos Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Xaa Tyr, mostrada en la SEC ID Nº: 3, en la que Xaa es Asp o Glu,

en la que dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión a VEGF es capaz de bloquear la interacción de VEGF165 recombinante humano con el VEGFR-2 recombinante humano con una velocidad de inhibición ≥ 60%.

6. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 5, en el que dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina es un VHH que se ha obtenido por optimización de secuencia, opcionalmente después de maduración por afinidad de un dominio variable sencillo de inmunoglobulina parental VHH.

7. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 6, en el que dicho VHH de unión a DII4 se ha obtenido a partir del VHH parental con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las SEC ID Nos: 4-20 y en la Tabla 5.

8. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 7, en el que dicho VHH parental tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 10.

9. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 8, en el que dicho VHH de unión a DII4 se ha obtenido por optimización de secuencia de un VHH madurado por afinidad derivado del VHH con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 10, en el que dicho VHH madurado por afinidad se selecciona de los VHH que tiene secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID Nos: 21-27 y en la Tabla 16.

10. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 9, en el que dicho VHH madurado por afinidad tiene una secuencia de aminoácidos en la SEC ID Nº: 22 y en el que dicho VHH de secuencia optimizada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las SEC ID Nos: 34 y

35 y en la Tabla 23.

11. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 7, en el que dicho VHH parental tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 12.

12. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 11, en el que dicho VHH de unión a DII4 se ha obtenido por optimización de secuencia de un VHH madurado por afinidad derivado del VHH con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 12, en el que dicho VHH madurado por afinidad se selecciona de los VHH que tienen secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID Nos: 28-30 y en la Tabla 17.

13. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 12, en el que dicho VHH madurado por afinidad tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 32 y en el que dicho VHH de secuencia optimizada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las SEC ID Nos: 40 y 41.

14. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 6, en el que dicha unión a VEGF es un VHH que se deriva de un VHH que tiene una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en las SEC ID Nos: 42-44 y en la Tabla 32.

15. Una molécula de unión biespecífica de unión de la reivindicación 14, en el que dicho VHH de unión a VEGF se ha obtenido por optimización de secuencia de un VHH con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 43.

16. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 15, en el que dicho VHH de secuencia optimizada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las SEC ID Nos: 63 y 64 y en la Tabla 59.

17. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 3, en el que el componente de unión a VEGF es un VHH biparotópico, en el que los VHH que forman los bloques de construcción de dicho VHH biparotópico se une a epítopos no solapantes.

18. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 17, en el que al menos un VHH es capaz de bloquear la interacción entre VEGF humano recombinante y el VEGFR-2 humano recombinante con una tasa de inhibición ≥ 60% y en el que al menos un VHH es capaz de bloquear dicha interacción con una tasa de inhibición ≤ 60%.

19. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 18, en el que dicho VHH con una tasa de inhibición ≤ 60% es una variante de secuencia optimizada de un VHH con una secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 45.

20. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 19, en el que dicho VHH tiene una secuencia mostrada en las SEC ID Nos: 65 y 66 y en la Tabla o una secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 67 (Tabla 63).

21. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 5 que comprende
a) como componente de unión a DII4 un VHH con una secuencia seleccionada de las secuencias en la SEC ID Nº: 35 o 41, y
b) como componente de unión a VEGF
i. un VHH con una secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 64 o
ii. un VHH biparatópico que comprende un VHH con una secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 64 y un VHH con una secuencia mostrada en la SEC ID Nº: 67.

22. Una molécula de unión biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende una o más moléculas enlazadoras y/o restos de ampliación de la semivida.

23. Una molécula de unión biespecífica de la reivindicación 22, en el que dicho resto de ampliación de la semivida se une covalentemente a o se fusiona con un dominio variable sencillo de inmunoglobulina y se selecciona de una parte Fc, una albúmina, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de unión albumina o una molécula de polioxialquileno.

24. Una molécula de unión biespecífica la reivindicación 21 y 22, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº. 81.

311 D-2

25. Una molécula de unión biespecífica la reivindicación 21 y 22, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº. 82.

26. Una molécula de unión biespecífica la reivindicación 21 y 22, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº. 83.

27. Una molécula de unión biespecífica la reivindicación 21, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº. 84.

28. Una molécula de unión biespecífica la reivindicación 21 y 22, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº. 85.

29. Una molécula de unión biespecífica la reivindicación 21 y 22, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº. 86.

30. Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 o un vector que lo contiene.

31. Una célula hospedadora que contiene una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 30.

32. Una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión a VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, como el ingrediente activo.

33. La composición farmacéutica de la reivindicación 32 para el tratamiento de una enfermedad que está asociada con efectos mediados por VEGF sobre la angiogénesis.

34. La composición farmacéutica de la reivindicación 22 para el tratamiento del cáncer y enfermedades cancerosas.

35. La composición farmacéutica de la reivindicación 32 para el tratamiento de enfermedades oculares.

312

Resumen

Moléculas de unión biespecíficas, en particular dominios variables sencillos de inmunoglobulina tales como VHH y anticuerpos de dominio, que comprenden un componente de unión a VEGF y un componente de unión a DII4 en una molécula. Composiciones farmacéuticas que contienen los mismos y su uso en el tratamiento de enfermedades que están asociadas con efectos mediados por VEGF y DII4 sobre la angiogénesis. Ácidos nucleicos que codifican las moléculas de unión biespecíficas, células hospedadoras y métodos para prepararlas.


1 100
DLL4 humano (1) MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGR
DLL4 rhesus (1) MAAASWSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFVNERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGSVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGR
DLL4 cinomolgo (1) MAAASWSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFVNERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGSVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGR
101 200
DLL4 humano (101) NPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVC
DLL4 rhesus (101) NPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVC
DLL4 cinomolgo (101) NPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVC
201 300
DLL4 humano (201) QPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
DLL4 rhesus (201) QPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
DLL4 cinomolgo (201) QPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
301 400
DLL4 humano (301) SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCE
DLL4 rhesus (301) SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGASYACECPPNFTGSNCE
DLL4 cinomolgo (301) SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGASYACECPPNFTGSNCE
401 500
DLL4 humano (401) KKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLS
DLL4 rhesus (401) KKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCERHVSDCARNPCAHGGTCHDLESGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLS
DLL4 cinomolgo (401) KKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCERHVSDCARNPCAHGGTCHDLESGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLS
501 600
DLL4 humano (501) TDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL
DLL4 rhesus (501) TDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL
DLL4 cinomolgo (501) TDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL
601 685
DLL4 humano (601) DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
DLL4 rhesus (601) DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
DLL4 cinomolgo (601) DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV

Fig. 1

Fig. 2

Construcciones hDLL4

hDLL4.1: $DSL^{173-217} - EGF1^{218-251} - (His)6$
hDLL4.2: $DSL^{155-217} - EGF1^{218-251} - (His)6$
hDLL4.3: $DSL^{173-217} - EGF1^{218-251} - EGF2^{252-282} - (His)6$
hDLL4.4: $DSL^{155-217} - EGF1^{218-251} - EGF2^{252-282} - (His)6$
hDLL4.5: $DSL^{173-217} - EGF1^{218-251} - EGF2^{252-282} - EGF3^{284-322} - (His)6$
hDLL4.6: $DSL^{155-217} - EGF1^{218-251} - EGF2^{252-282} - EGF3^{284-322} - (His)6$

Construcciones mDLL4

mDLL4.7: $DSL^{174-218} - EGF1^{219-252} - (His)6$
mDLL4.8: $DSL^{156-218} - EGF1^{219-252} - (His)6$
mDLL4.9: $DSL^{174-218} - EGF1^{219-252} - EGF2^{252-282} - (His)6$
mDLL4.10: $DSL^{156-218} - EGF1^{219-252} - EGF2^{252-282} - (His)6$
mDLL4.11: $DSL^{174-218} - EGF1^{219-252} - EGF2^{252-282} - EGF3^{285-323} - (His)6$
mDLL4.12: $DSL^{156-218} - EGF1^{219-252} - EGF2^{252-282} - EGF3^{285-323} - (His)6$

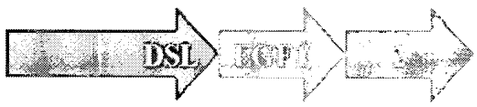
hDLL4.1 | mDLL4.7



hDLL4.2 | mDLL4.8



hDLL4.3 | mDLL4.9



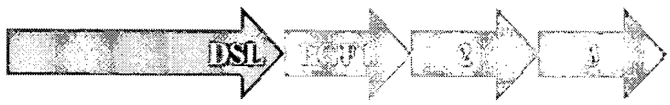
hDLL4.4 | mDLL4.10



hDLL4.5 | mDLL4.11



hDLL4.6 | mDLL4.12



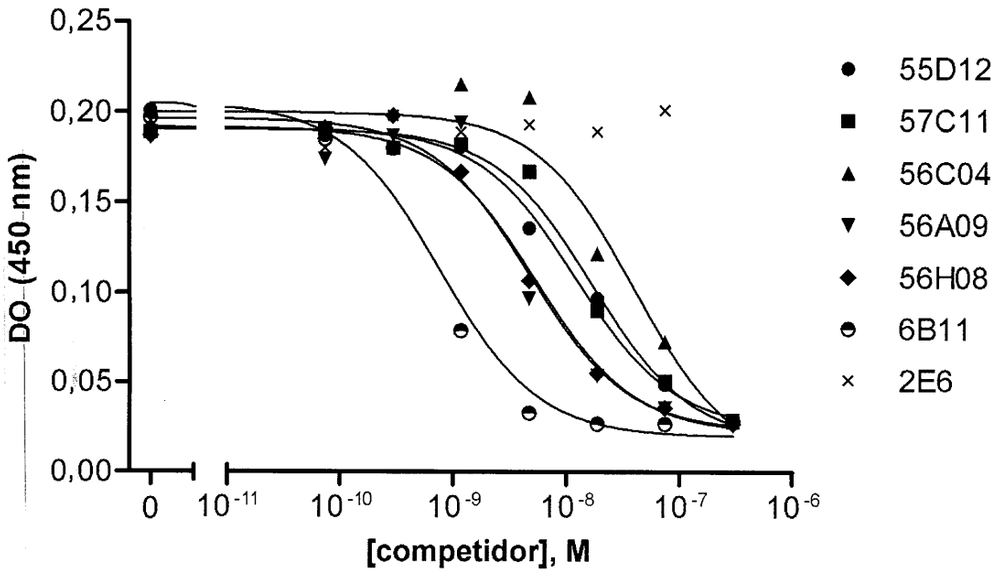

0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
DO (450 nm)
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M
55D12
57C11
56C04
56A09
56H08
6B11
2E6

Fig. 3-1

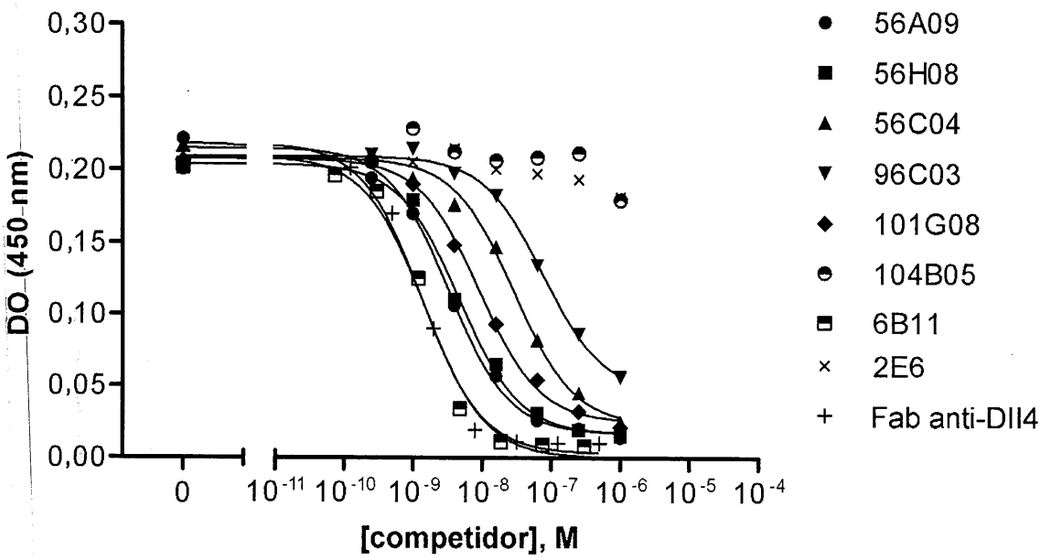

0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
DO (450-nm)
0
10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5 10-4
[competidor], M
56A09
56H08
56C04
96C03
101G08
104B05
6B11
2E6
Fab anti-DII4

Fig. 3-2

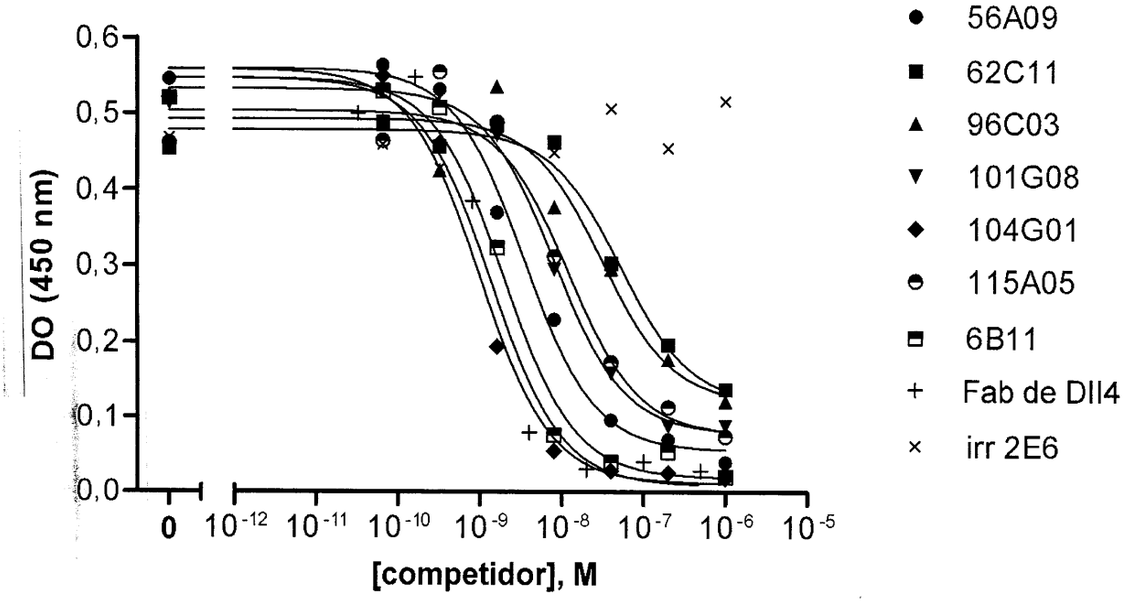

DO (450 nm)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competidor], M
56A09
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05
6B11
Fab de Dll4
irr 2E6

Fig. 3-3

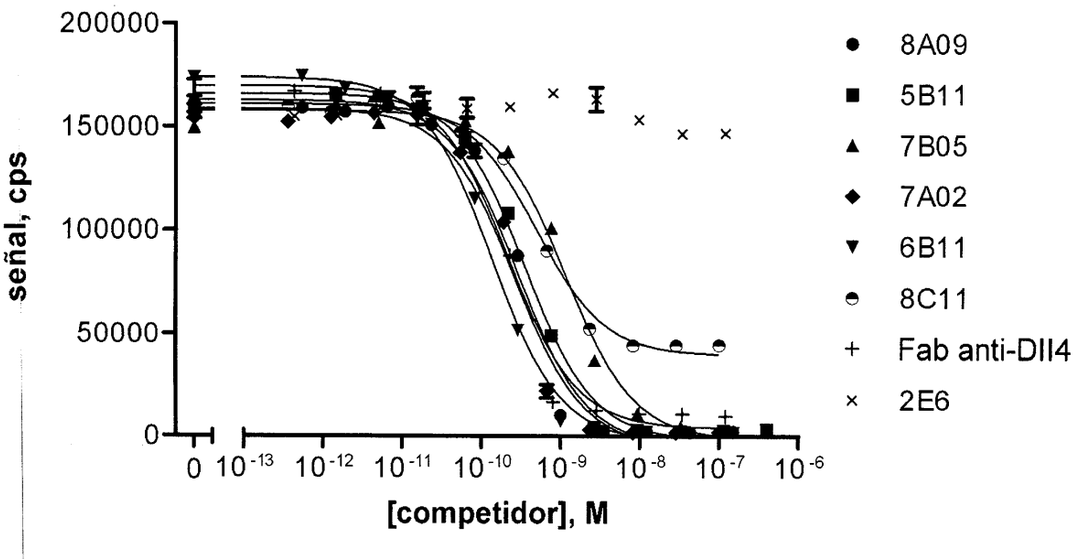

200000
150000
100000
50000
0
señal, cps
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competidor], M
8A09
5B11
7B05
7A02
6B11
8C11
Fab anti-DII4
2E6

Fig. 4-1

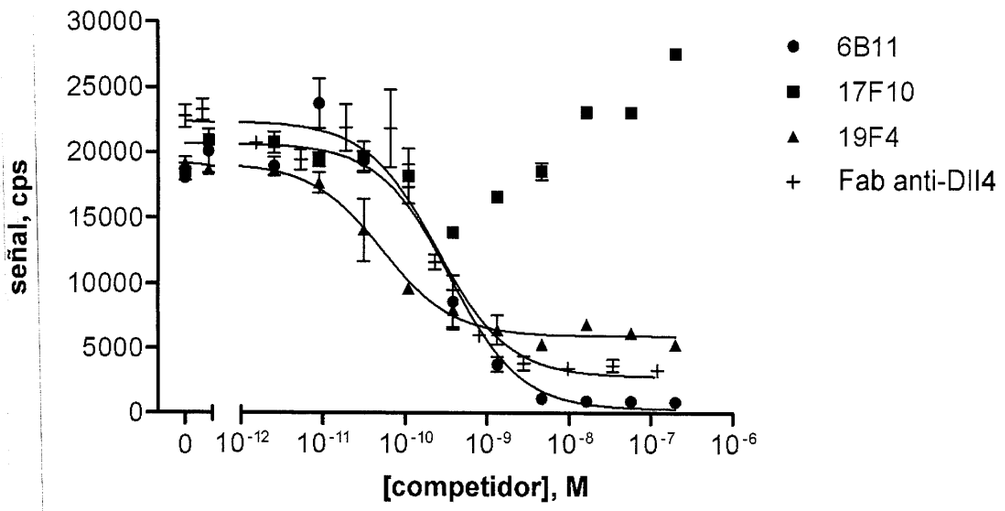

señal, cps
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M
6B11
17F10
19F4
Fab anti-DII4

Fig. 4-2

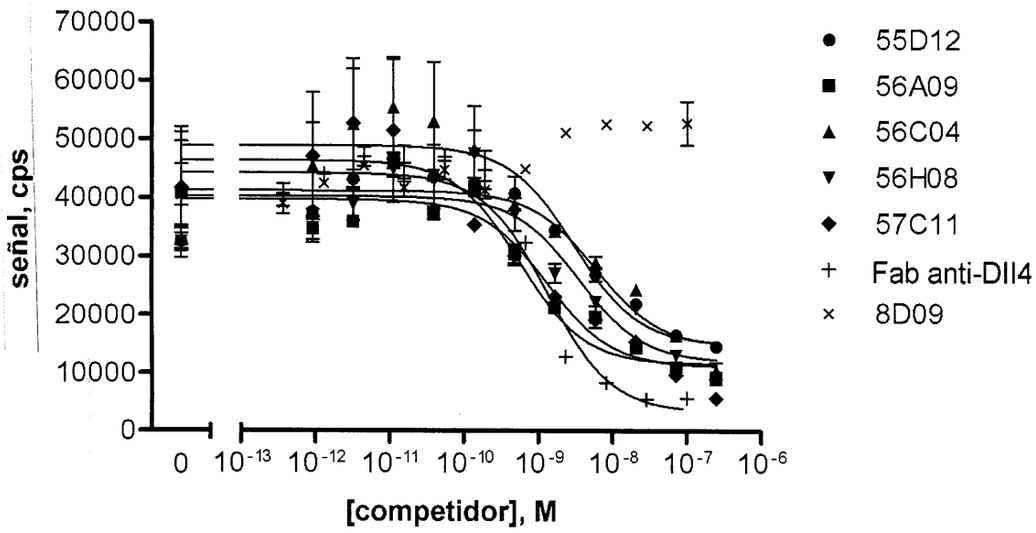

señal, cps
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
Fab anti-DII4
8D09

Fig. 4-3

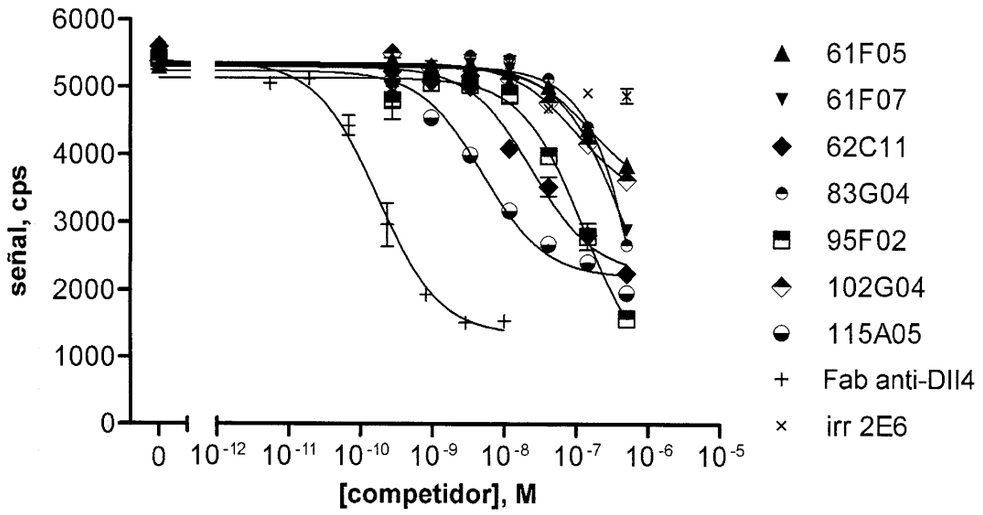

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
señal, cps
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competidor], M
61F05
61F07
62C11
83G04
95F02
102G04
115A05
Fab anti-DII4
irr 2E6

Fig. 4-4

225

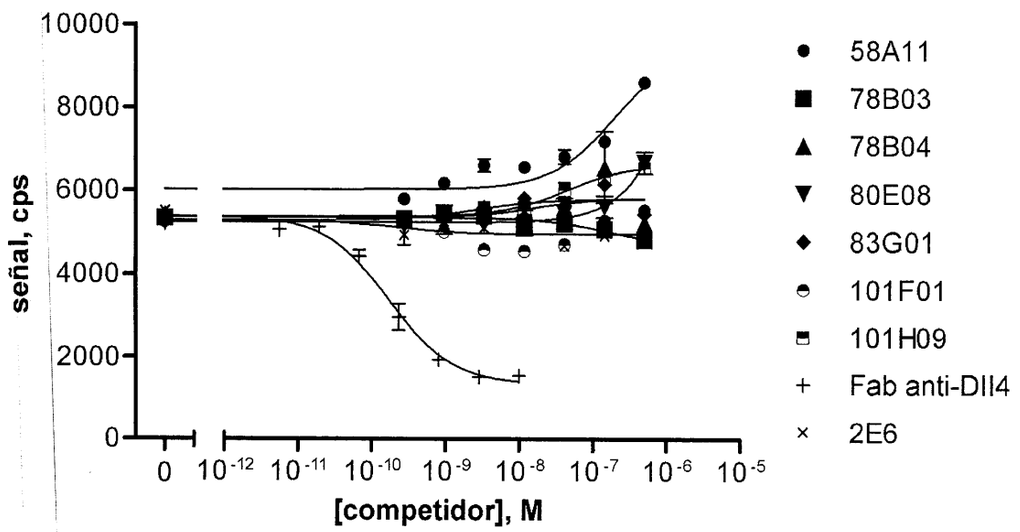

señal, cps
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competidor], M
58A11
78B03
78B04
80E08
83G01
101F01
101H09
Fab anti-DII4
2E6

Fig. 4-5

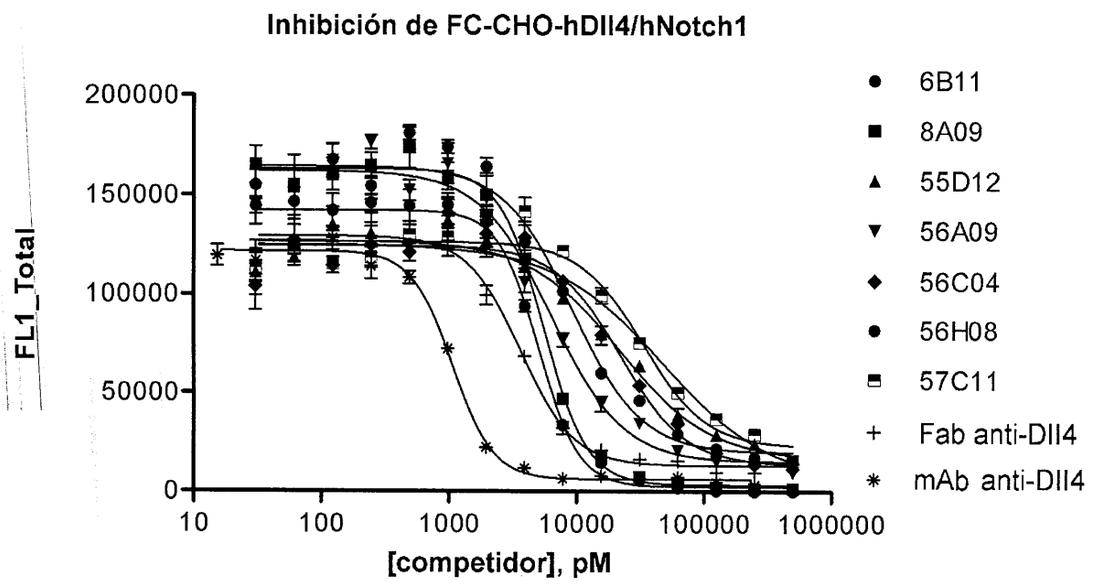

Inhibición de FC-CHO-hDll4/hNotch1
FL1_Total
200000
150000
100000
50000
0
10
100
1000
10000
100000
1000000
[competidor], pM
6B11
8A09
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
Fab anti-Dll4
mAb anti-Dll4

Fig. 5-1

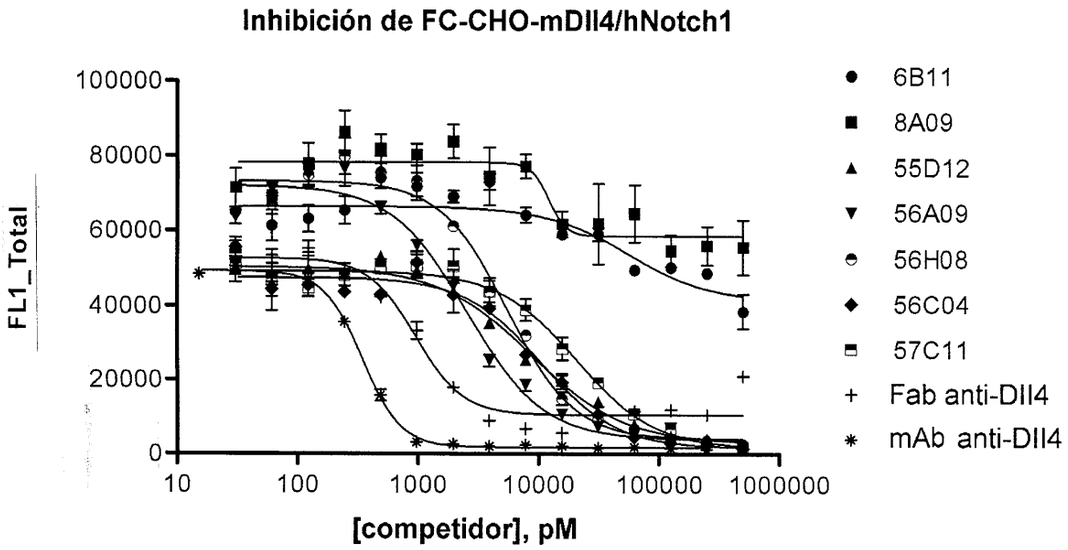

Inhibición de FC-CHO-mDll4/hNotch1
FL1_Total
100000
80000
60000
40000
20000
0
10
100
1000
10000
100000
1000000
[competidor], pM
6B11
8A09
55D12
56A09
56H08
56C04
57C11
Fab anti-Dll4
mAb anti-Dll4

Fig. 5-2

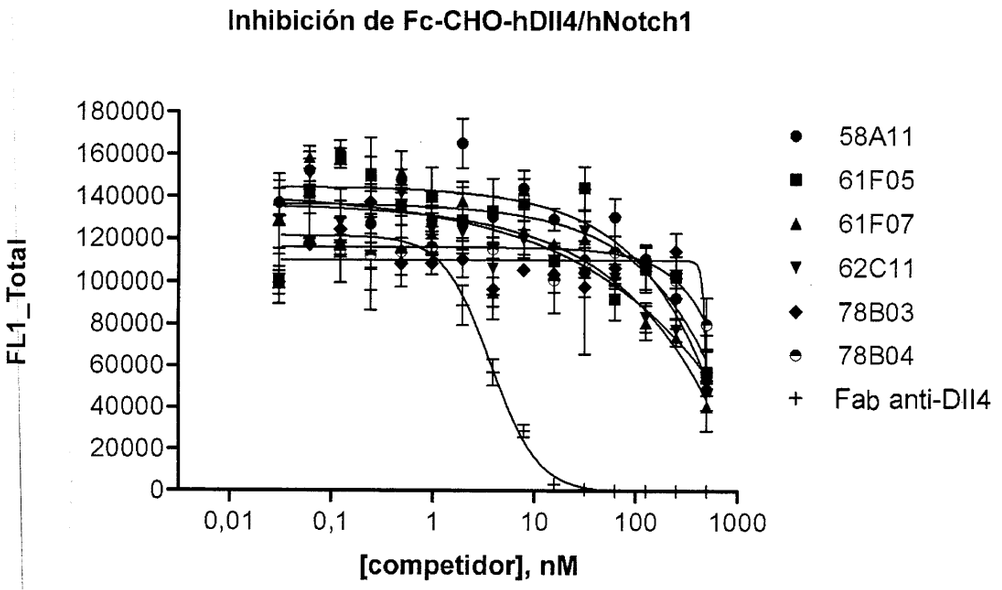

Inhibición de Fc-CHO-hDll4/hNotch1
FL1_Total
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
58A11
61F05
61F07
62C11
78B03
78B04
Fab anti-Dll4

Fig. 5-3

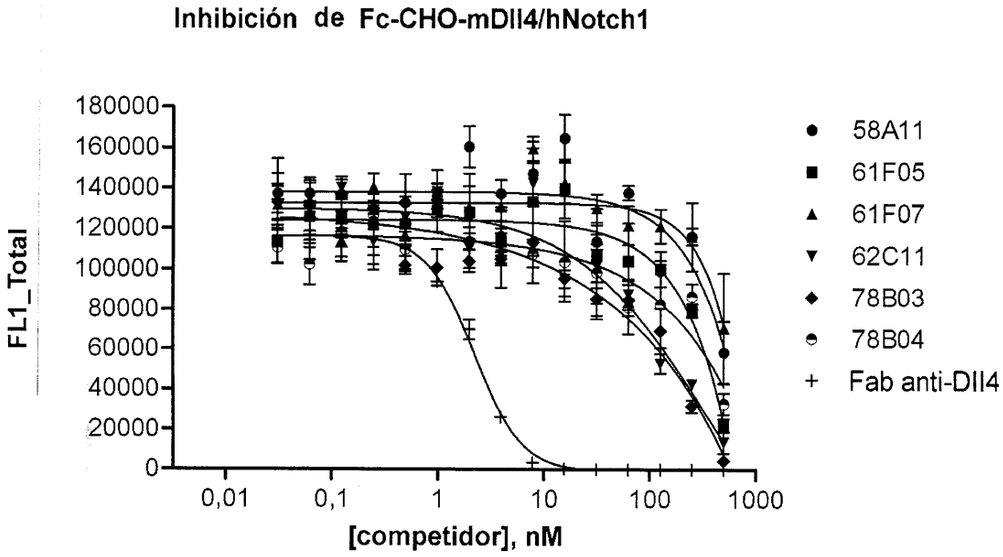

Inhibición de Fc-CHO-mDll4/hNotch1
FL1_Total
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
58A11
61F05
61F07
62C11
78B03
78B04
Fab anti-Dll4

Fig. 5-4

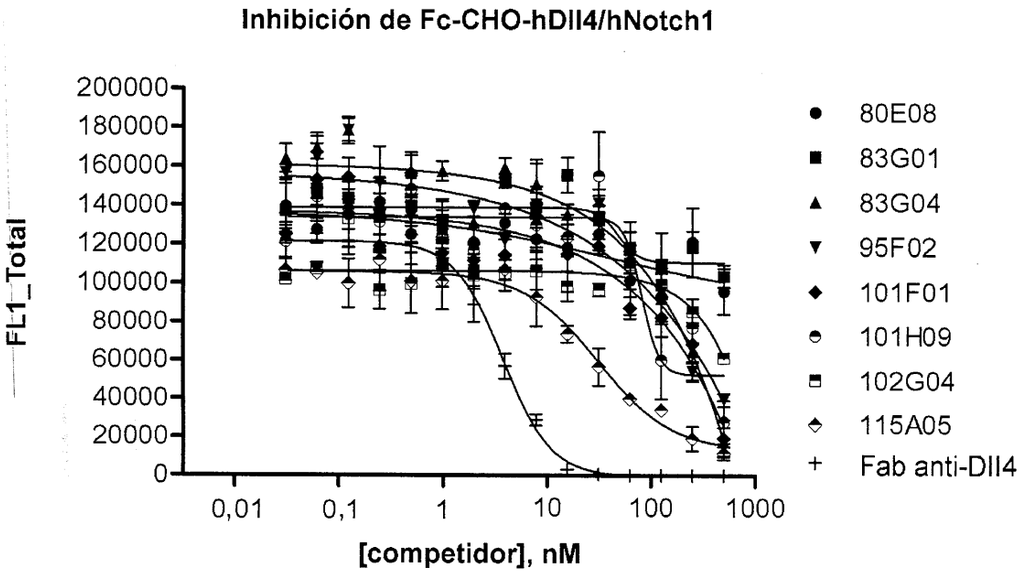

Inhibición de Fc-CHO-hDll4/hNotch1
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
80E08
83G01
83G04
95F02
101F01
101H09
102G04
115A05
Fab anti-Dll4

Fig. 5-5

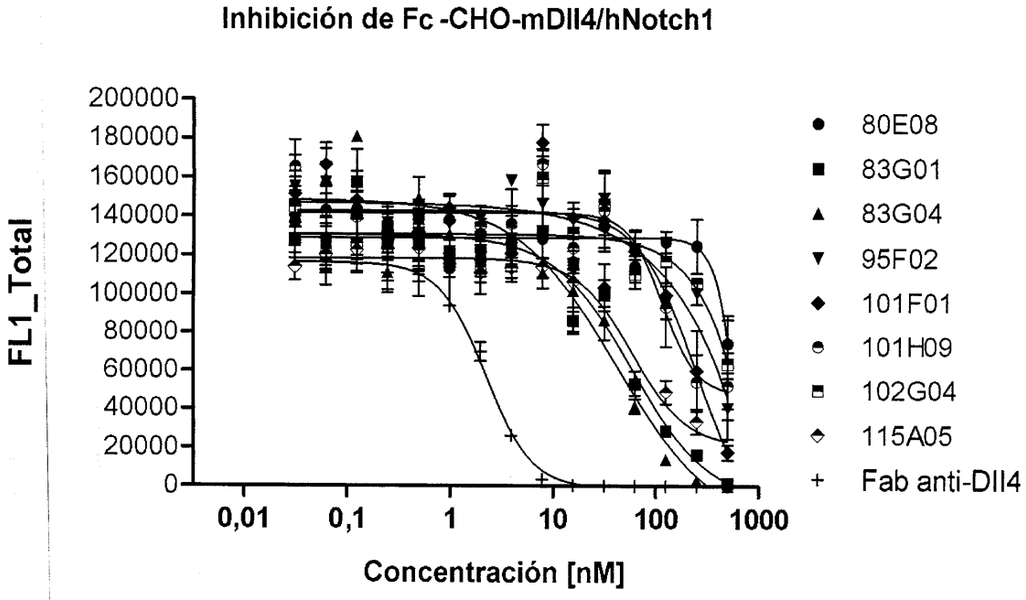

Inhibición de Fc -CHO-mDll4/hNotch1
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]
80E08
83G01
83G04
95F02
101F01
101H09
102G04
115A05
Fab anti-Dll4

Fig. 5-6

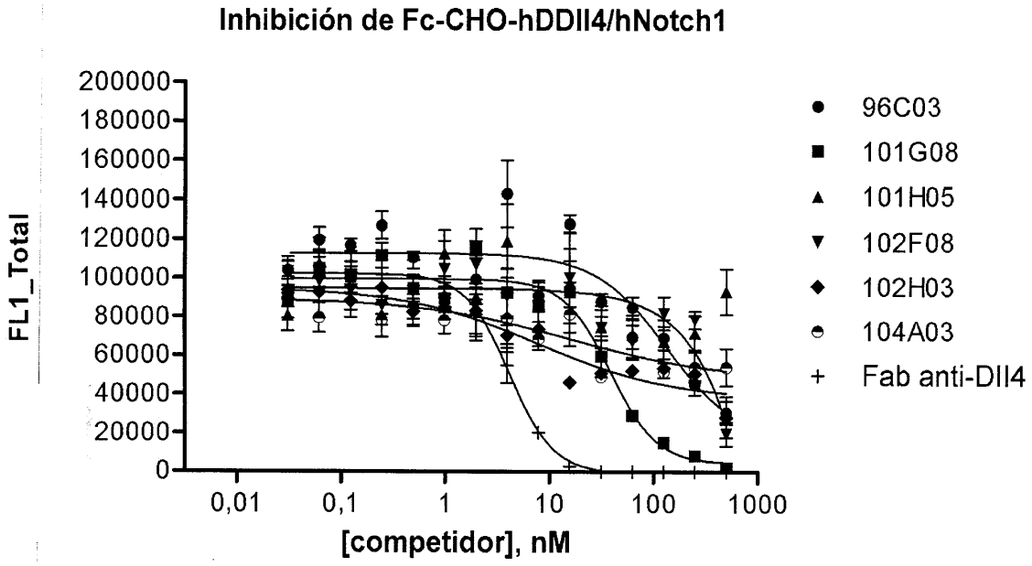

Inhibición de Fc-CHO-hDDll4/hNotch1
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
96C03
101G08
101H05
102F08
102H03
104A03
Fab anti-Dll4

Fig. 5-7

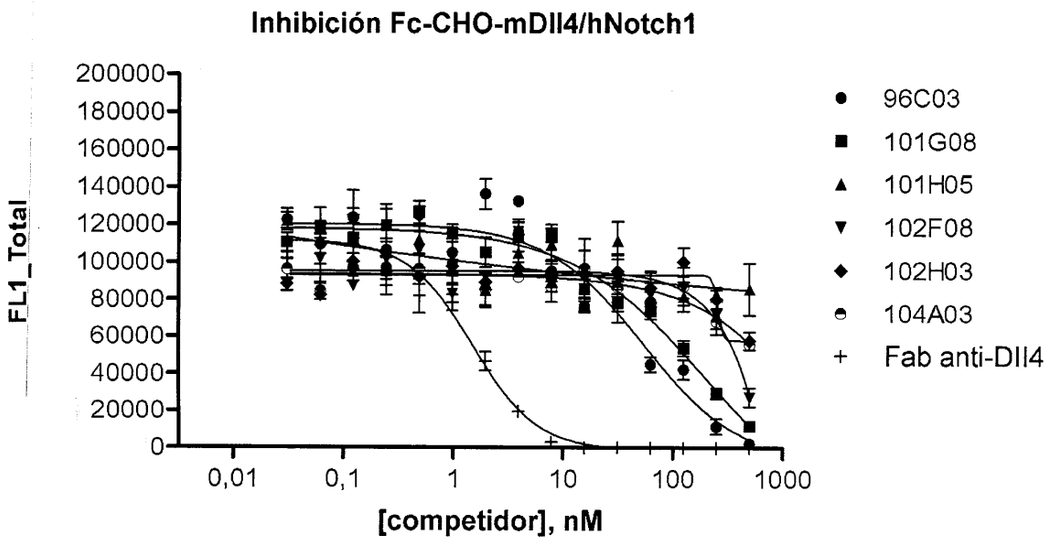

Inhibición Fc-CHO-mDll4/hNotch1
FL1_Total
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
96C03
101G08
101H05
102F08
102H03
104A03
Fab anti-Dll4

Fig. 5-8

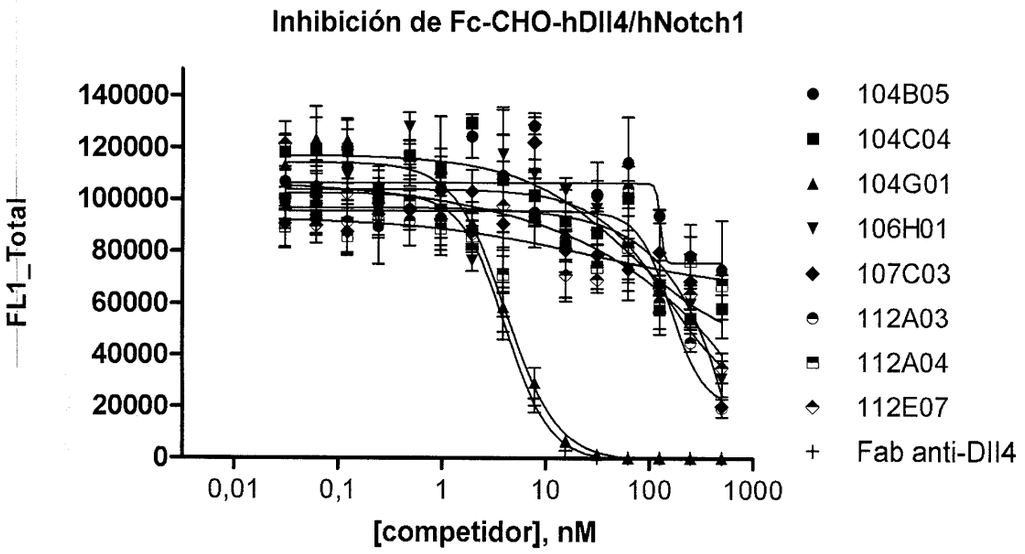

Inhibición de Fc-CHO-hDll4/hNotch1
FL1_Total
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
104B05
104C04
104G01
106H01
107C03
112A03
112A04
112E07
Fab anti-Dll4

Fig. 5-9

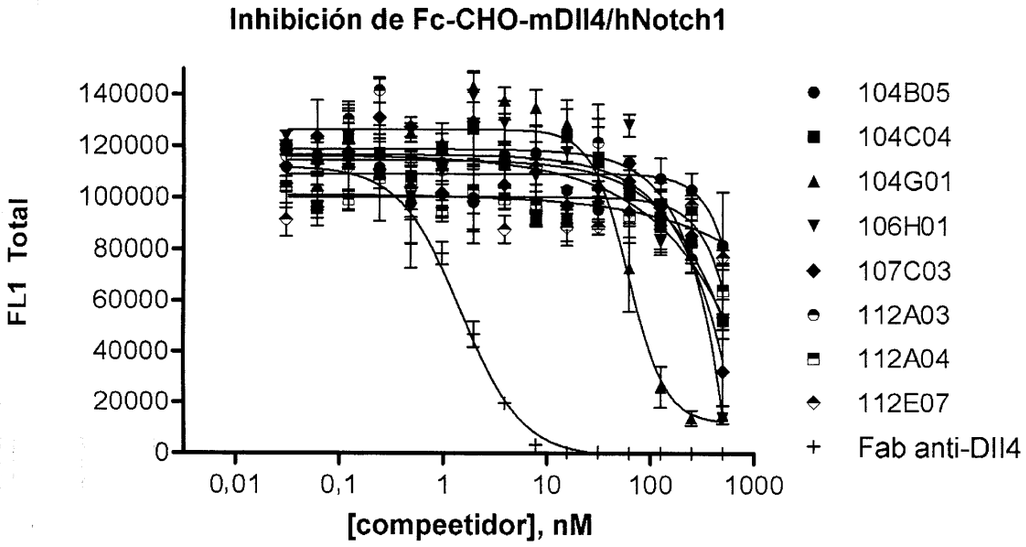

Inhibición de Fc-CHO-mDll4/hNotch1
FL1 Total
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[compeetidor], nM
104B05
104C04
104G01
106H01
107C03
112A03
112A04
112E07
Fab anti-Dll4

Fig. 5-10

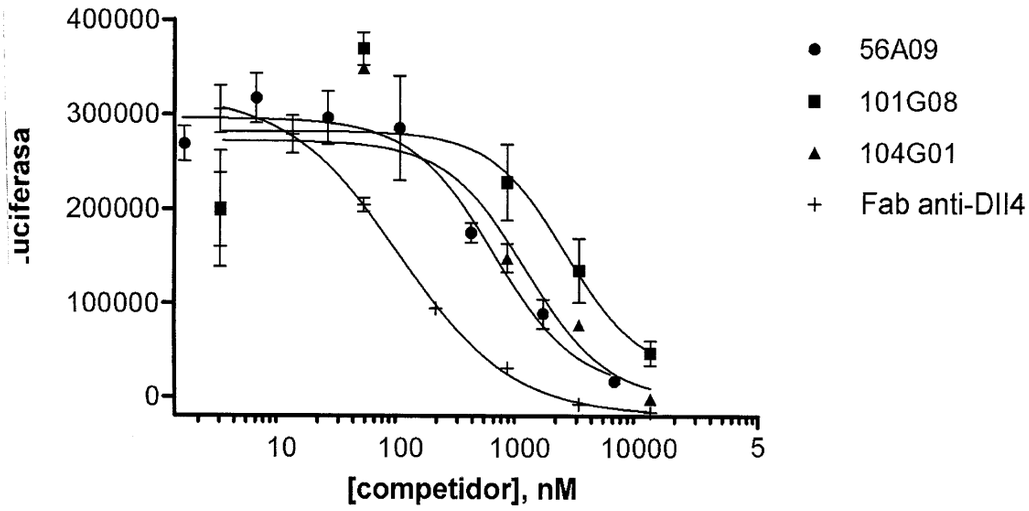


Fig. 6-1

334
333

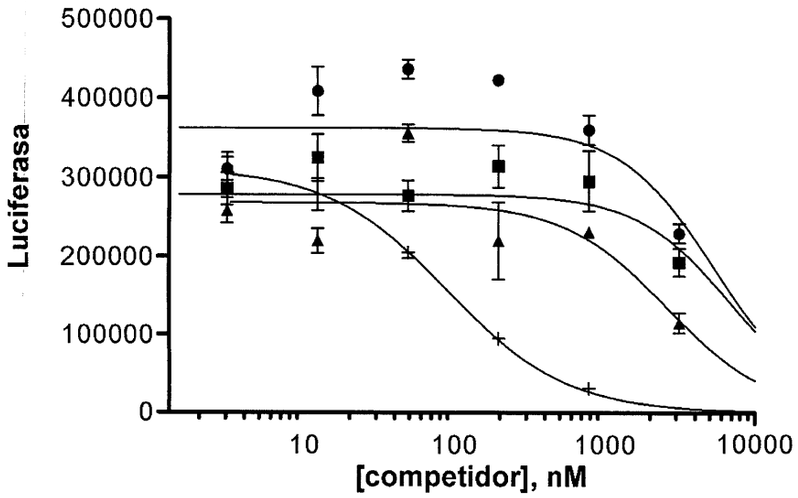

500000
400000
300000
200000
100000
0
Luciferasa
10
100
1000
10000
[competidor], nM
96C03
115A05
62C11
Fab anti-DII4

Fig. 6-2

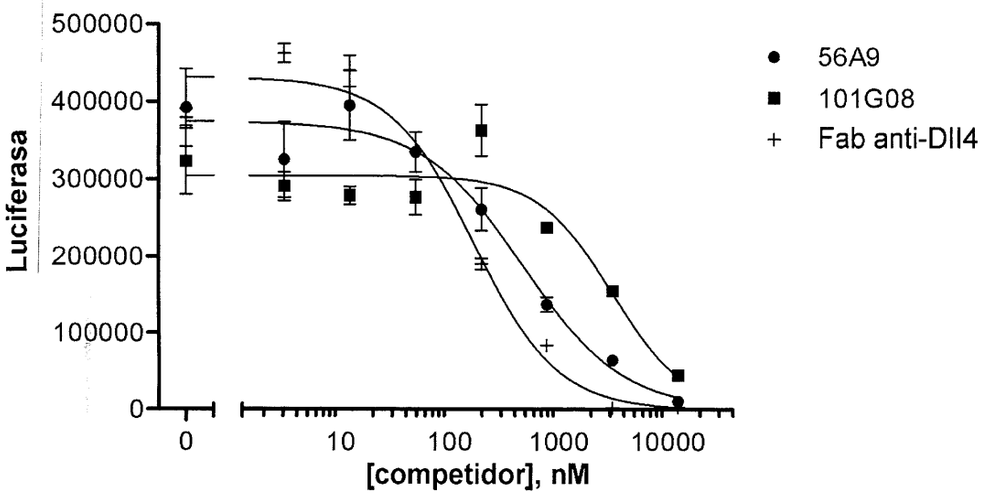

500000
400000
300000
200000
100000
0
Luciferasa
0
10
100
1000
10000
[competidor], nM
56A9
101G08
Fab anti-DII4

Fig. 6-3

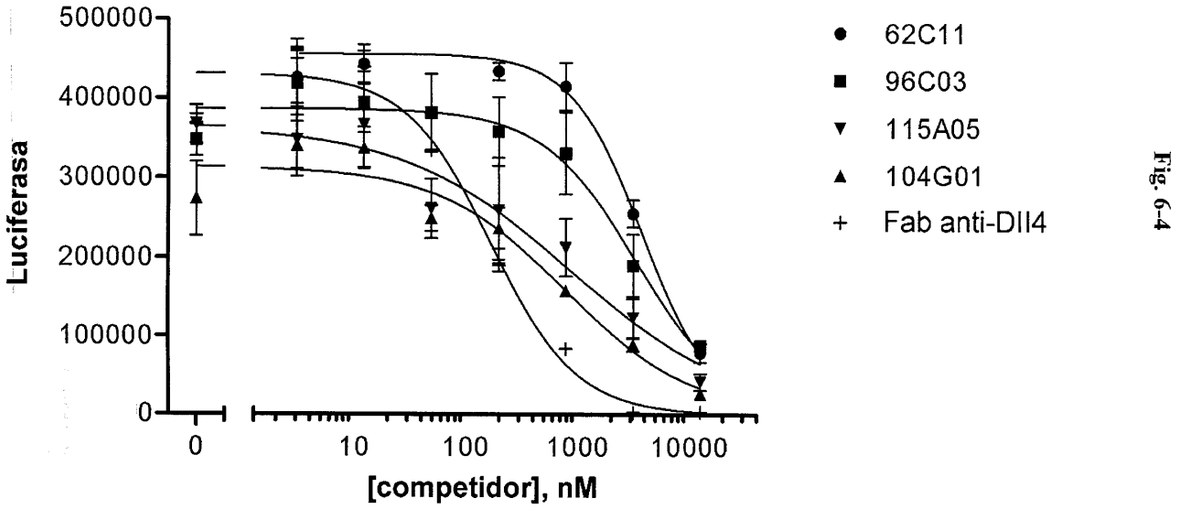

500000
400000
300000
200000
100000
0
Luciferasa
0
10
100
1000
10000
[competidor], nM
62C11
96C03
115A05
104G01
Fab anti-Dll4

Fig. 6-4

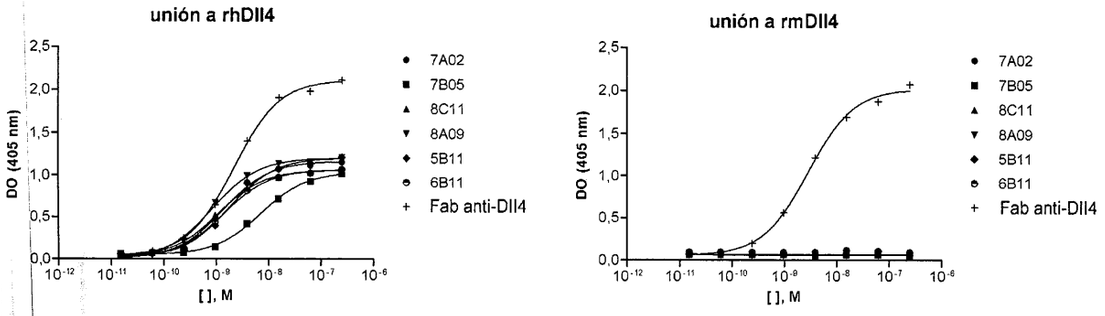
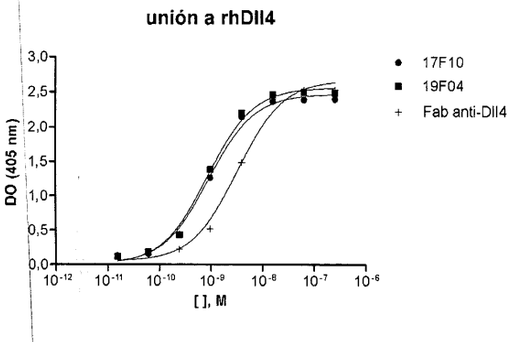

unión a rhDll4
DO (405 nm)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[ ], M
7A02
7B05
8C11
8A09
5B11
6B11
Fab anti-Dll4
unión a rmDll4
DO (405 nm)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[ ], M
7A02
7B05
8C11
8A09
5B11
6B11
Fab anti-Dll4

Fig. 7-1



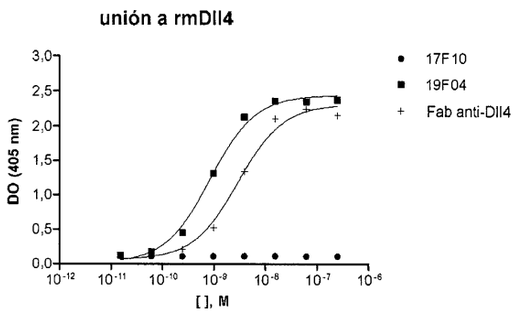


Fig. 7-2

338 439

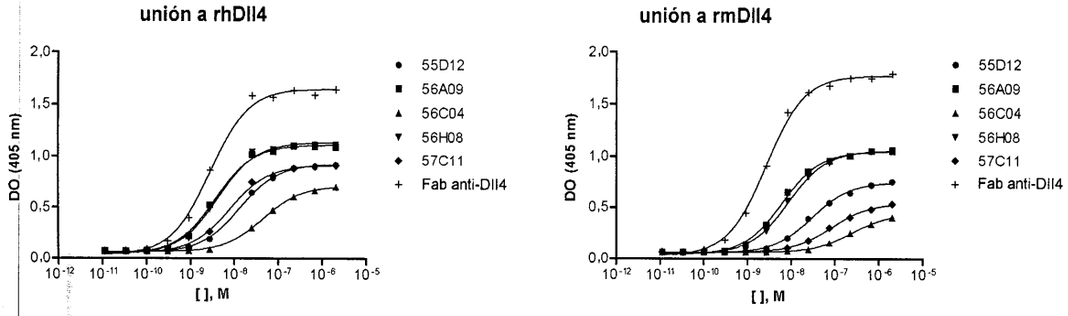

unión a rhDll4
DO (405 nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
Fab anti-Dll4
unión a rmDll4
DO (405 nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[ ], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
Fab anti-Dll4

Fig. 7-3

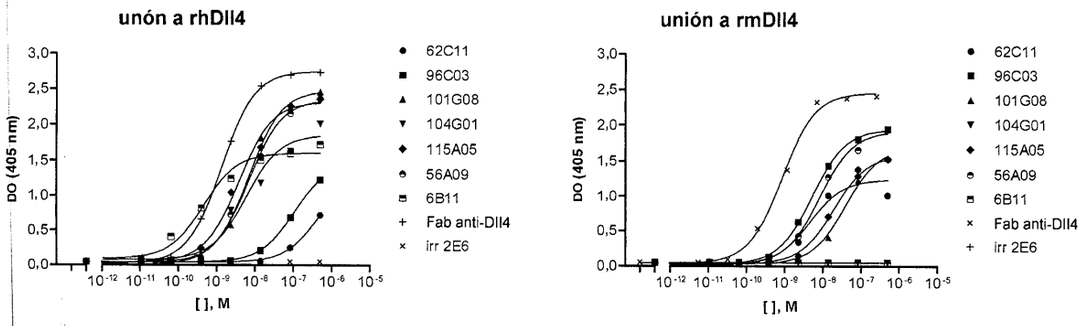


Fig. 7-4

540
1172

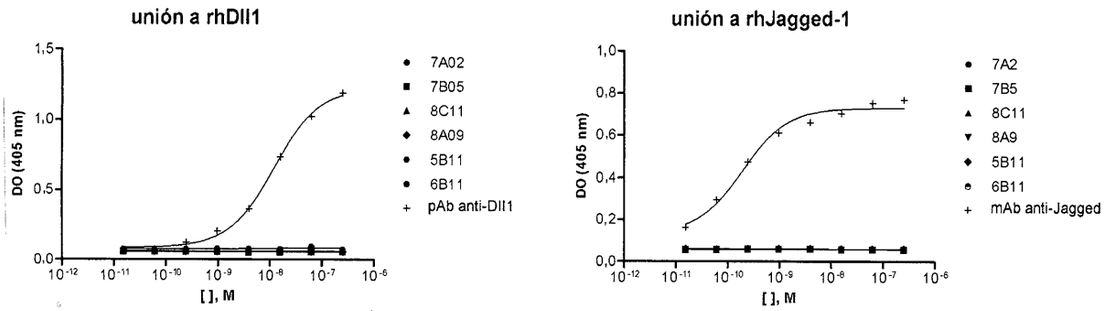

unión a rhDll1
DO (405 nm)
1,5
1,0
0,5
0,0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[ ], M
7A02
7B05
8C11
8A09
5B11
6B11
pAb anti-Dll1
unión a rhJagged-1
DO (405 nm)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[ ], M
7A2
7B5
8C11
8A9
5B11
6B11
mAb anti-Jagged

Fig. 8-1

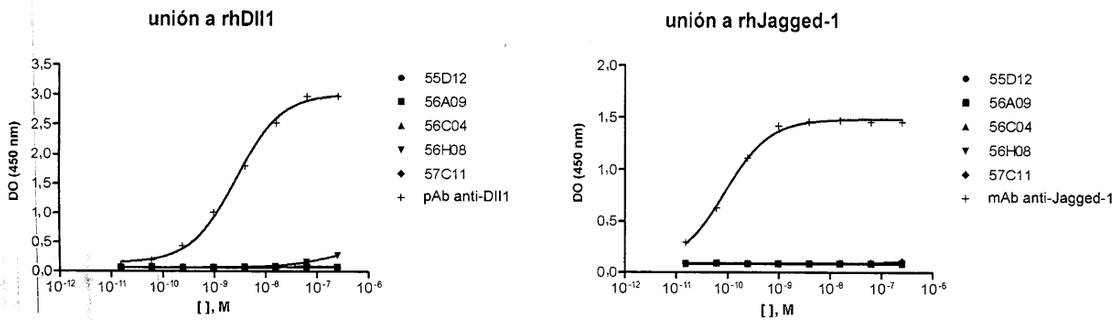

unión a rhDll1
DO (450 nm)
[ ], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
pAb anti-Dll1
unión a rhJagged-1
DO (450 nm)
[ ], M
55D12
56A09
56C04
56H08
57C11
mAb anti-Jagged-1

Fig. 8-2

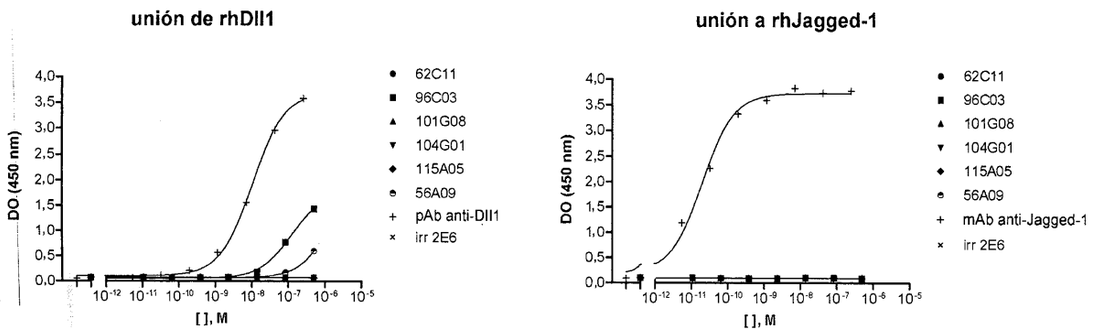


Fig. 8-3

3494
3493-

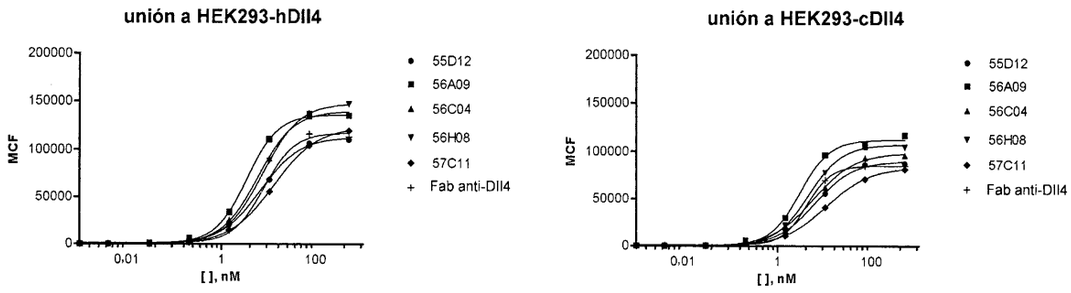


Fig. 9-1

ES 2 572 343 T3

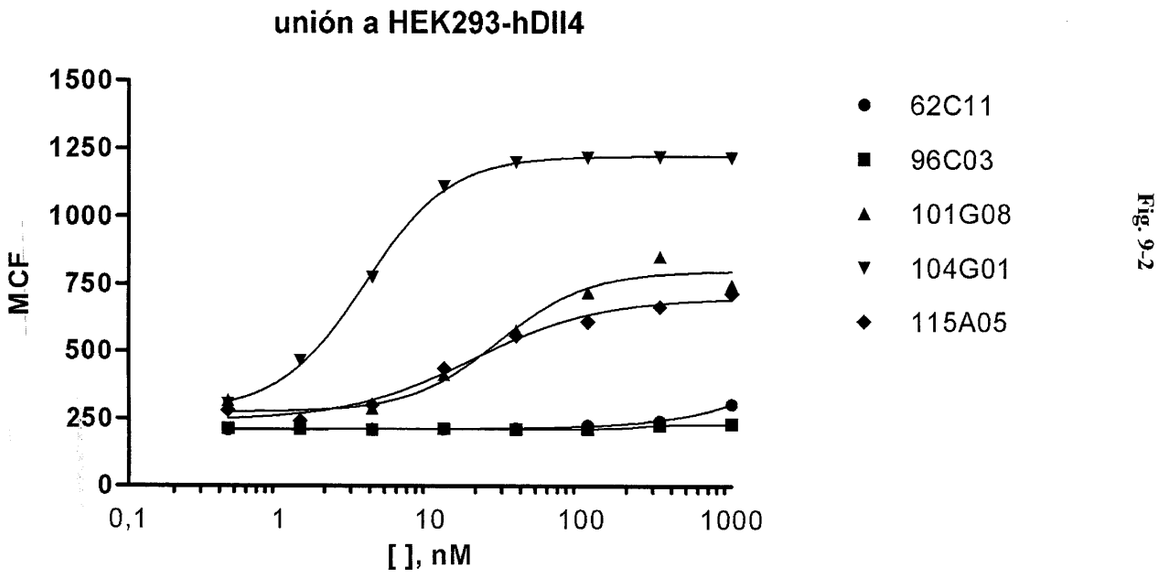

unión a HEK293-hDll4
MCF
1500
1250
1000
750
500
250
0
0,1
1
10
100
1000
[ ], nM
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05

Fig. 9-2

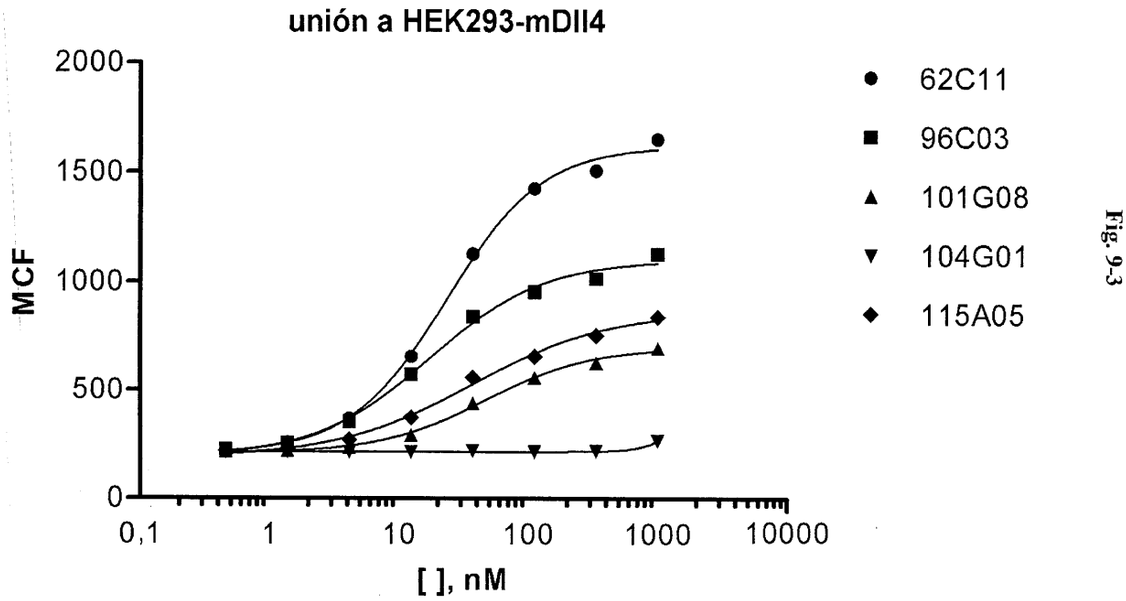

unión a HEK293-mDll4
MCF
2000
1500
1000
500
0
0,1
1
10
100
1000
10000
[ ], nM
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05

Fig. 9-3

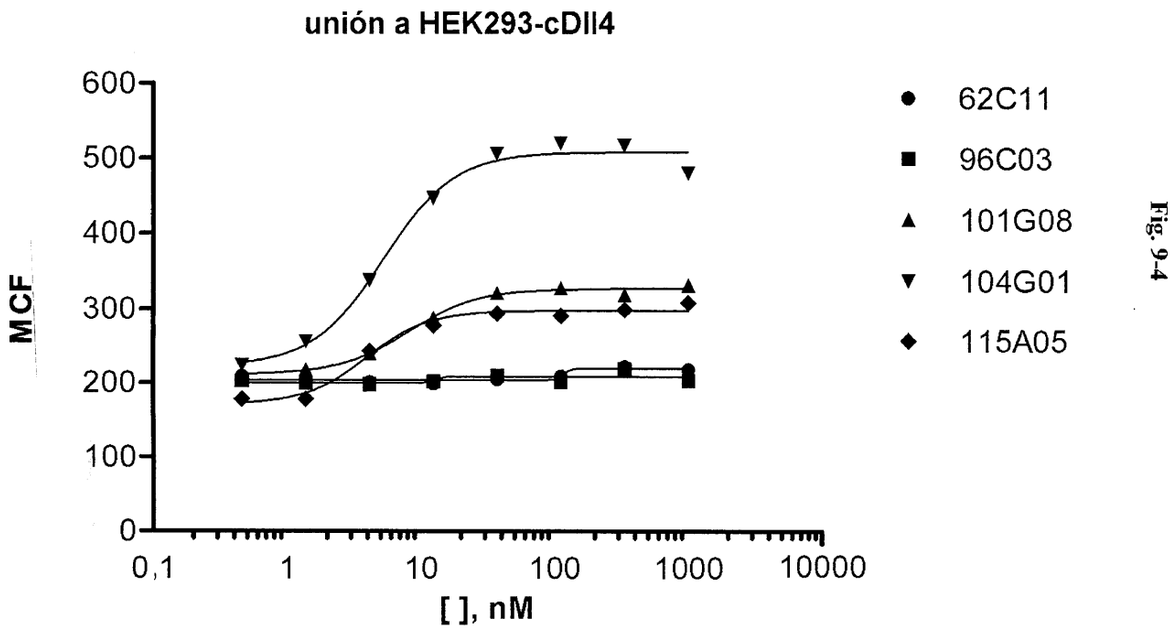

unión a HEK293-cDll4
MCF
600
500
400
300
200
100
0
0,1
1
10
100
1000
10000
[ ], nM
62C11
96C03
101G08
104G01
115A05

Fig. 9.4

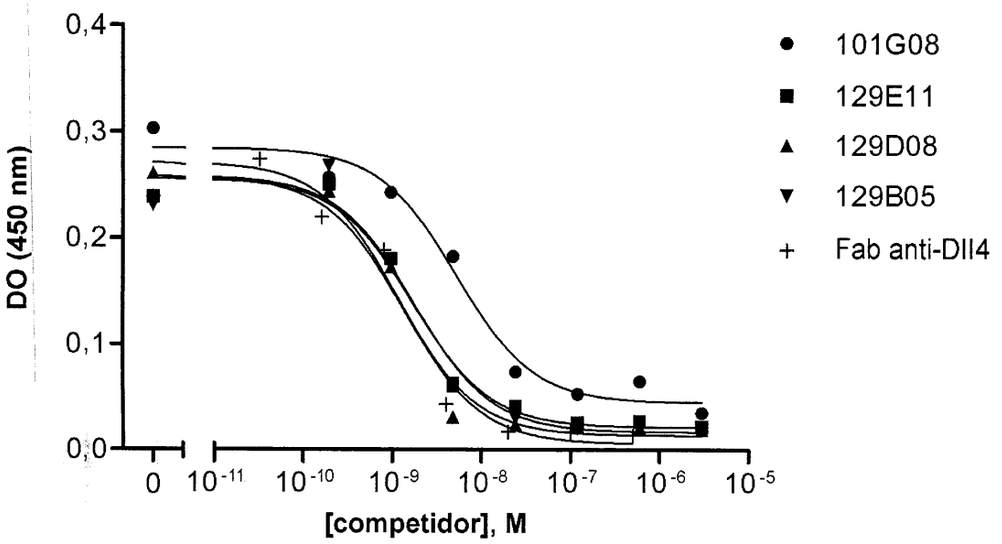

0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
DO (450 nm)
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competidor], M
101G08
129E11
129D08
129B05
Fab anti-Dll4

Fig. 10-1

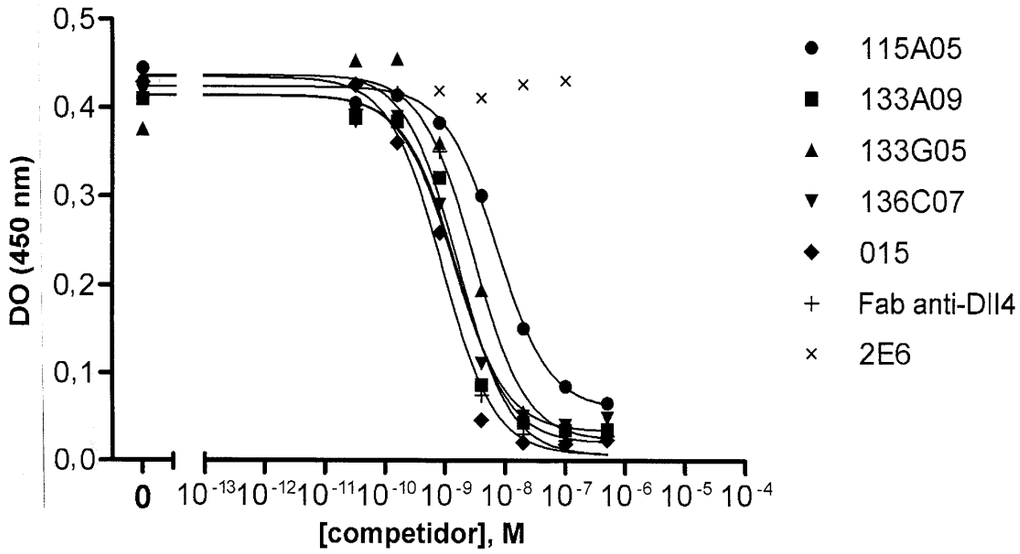

0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
DO (450 nm)
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5 10-4
[competidor], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
Fab anti-Dll4
2E6

Fig. 10-2

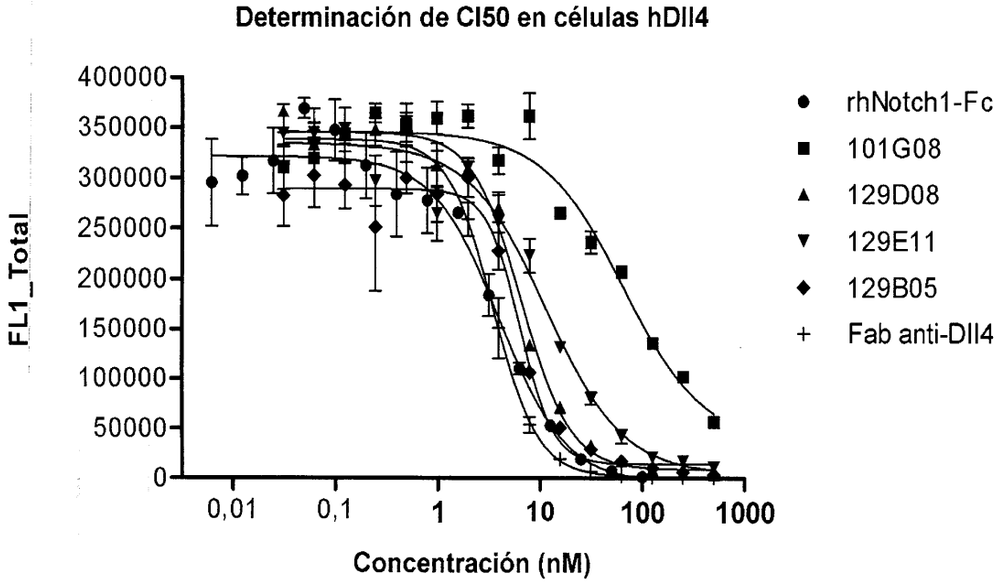

Determinación de CI50 en células hDll4
FL1_Total
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
rhNotch1-Fc
101G08
129D08
129E11
129B05
Fab anti-Dll4

Fig. 11-1

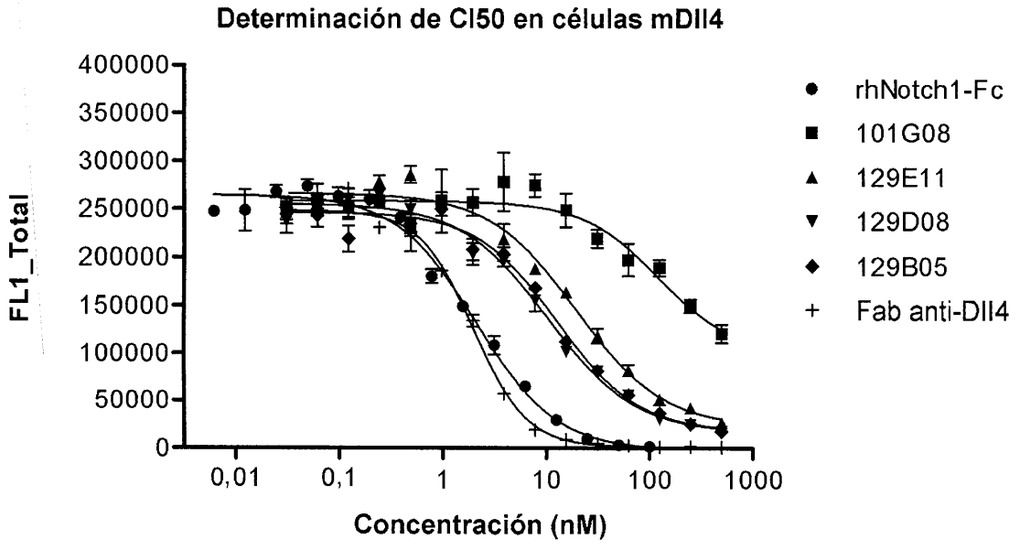

Determinación de CI50 en células mDll4
FL1_Total
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
rhNotch1-Fc
101G08
129E11
129D08
129B05
Fab anti-Dll4

Fig. 11-2

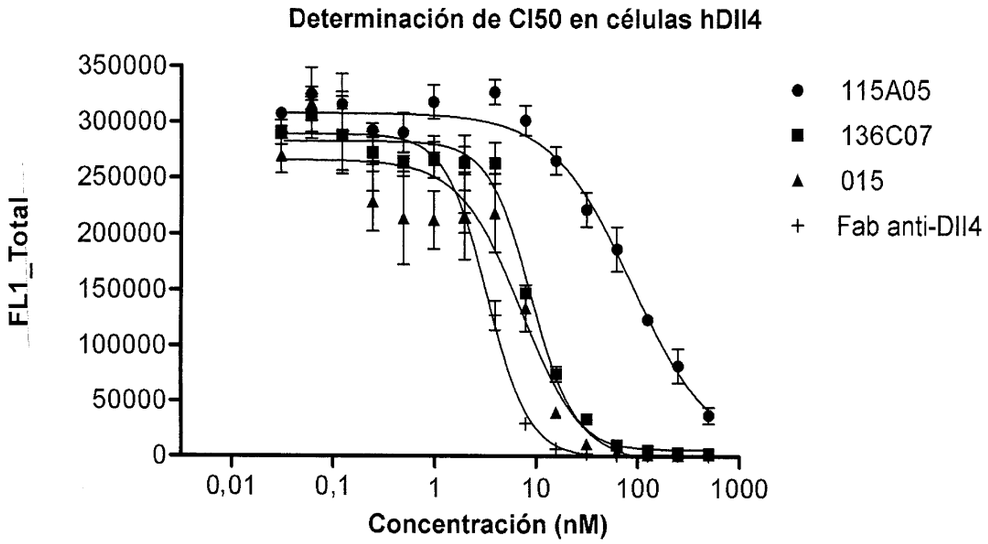

Determinación de CI50 en células hDll4
FL1_Total
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
115A05
136C07
015
Fab anti-Dll4

Fig. 11-3

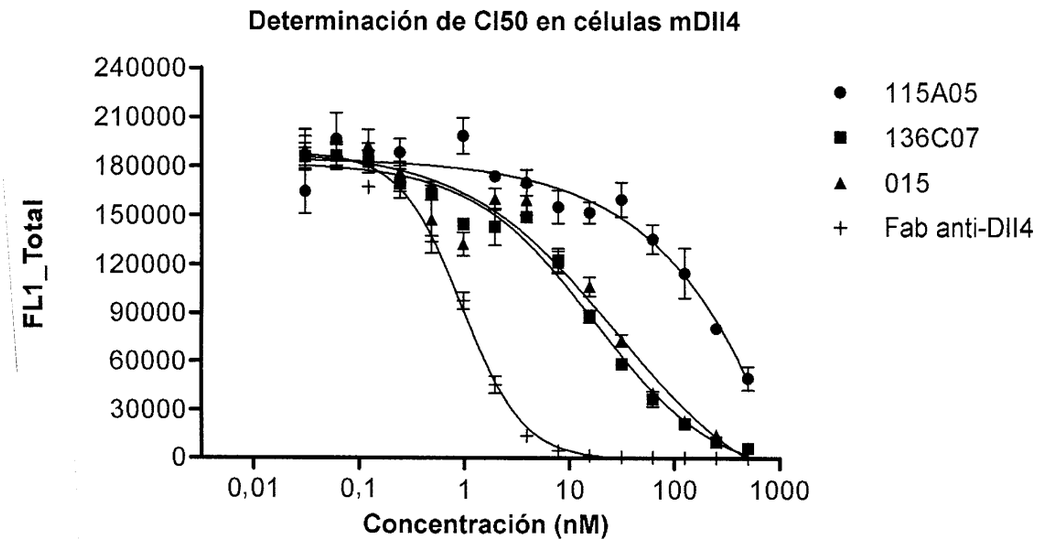

Determinación de CI50 en células mDll4
FL1_Total
240000
210000
180000
150000
120000
90000
60000
30000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
115A05
136C07
015
Fab anti-Dll4

Fig. 11-4

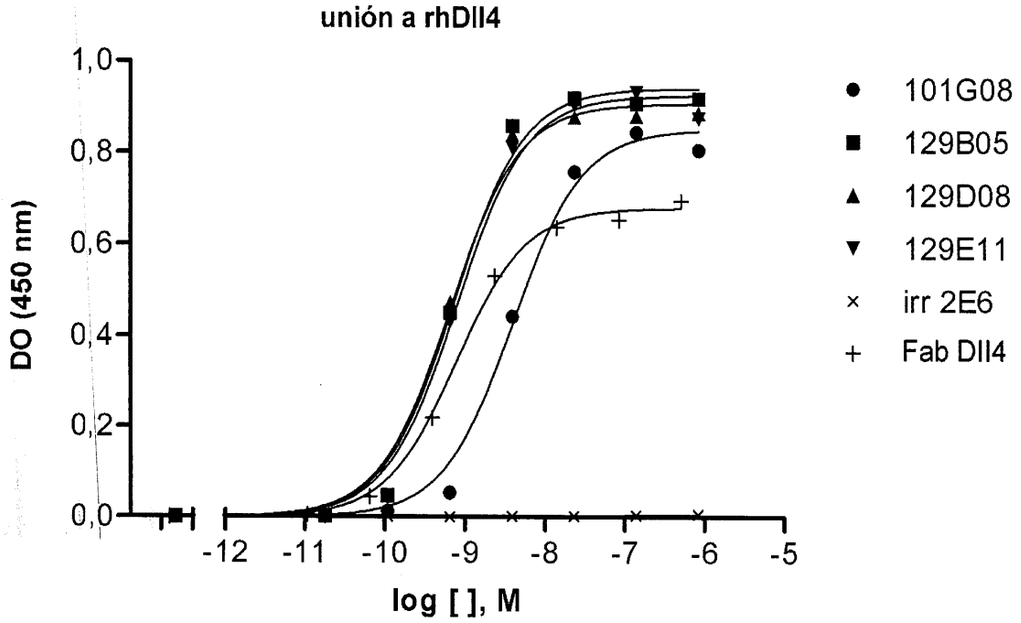

unión a rhDll4
DO (450 nm)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
irr 2E6
Fab Dll4

Fig. 12-1

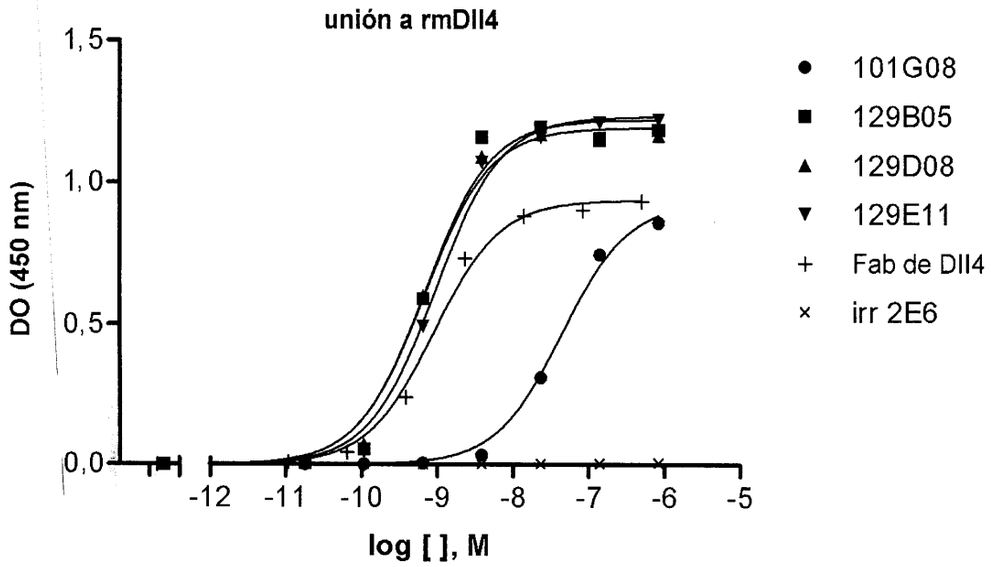

unión a rmDll4
DO (450 nm)
1,5
1,0
0,5
0,0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
Fab de Dll4
irr 2E6

Fig. 12-2

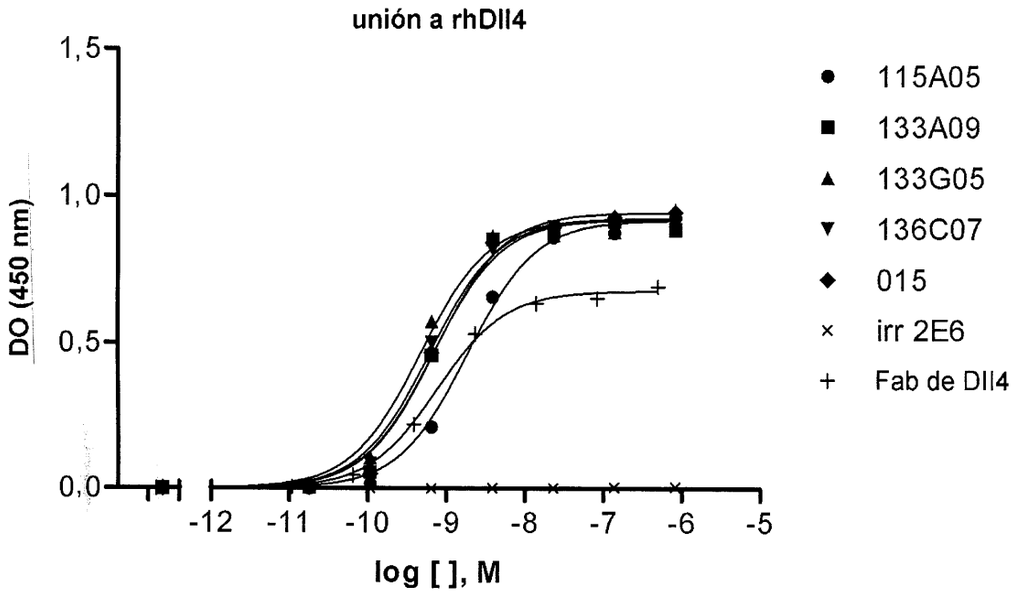

unión a rhDll4
1,5
1,0
0,5
0,0
DO (450 nm)
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
irr 2E6
Fab de Dll4

Fig. 12-3

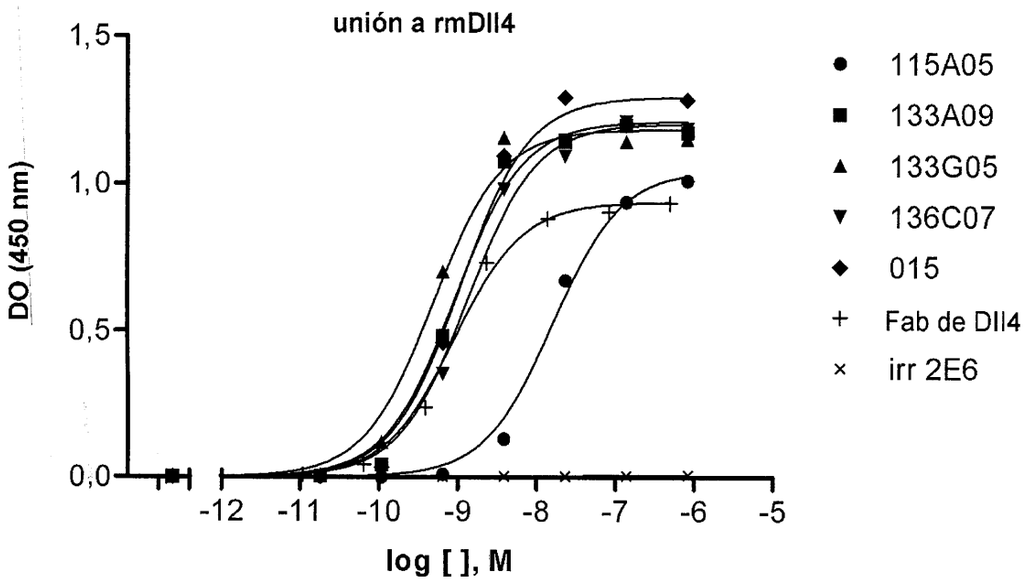

unión a rmDll4
DO (450 nm)
1,5
1,0
0,5
0,0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
Fab de Dll4
irr 2E6

Fig. 12-4

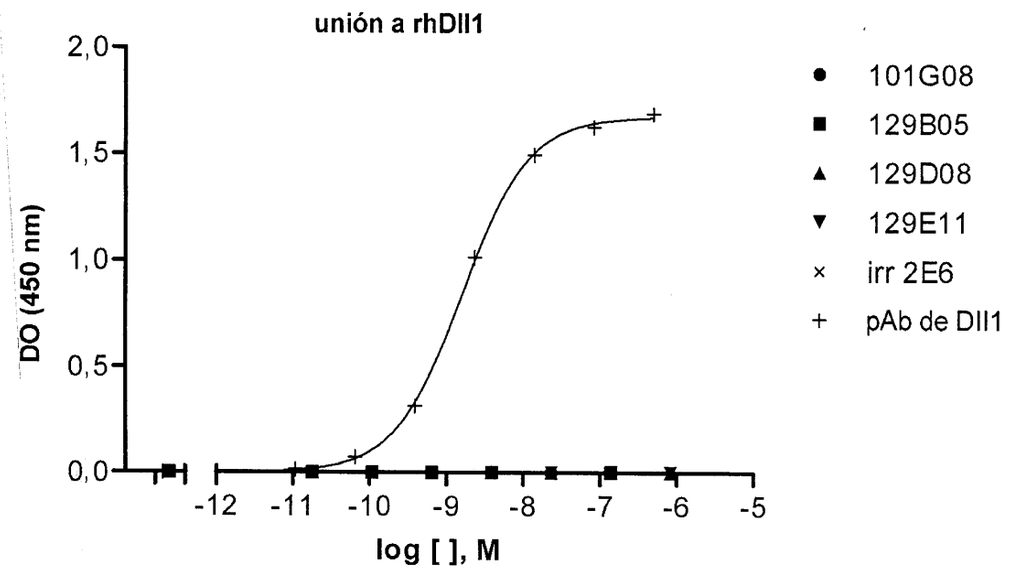

unión a rhDll1
DO (450 nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
irr 2E6
pAb de Dll1

Fig. 13-1

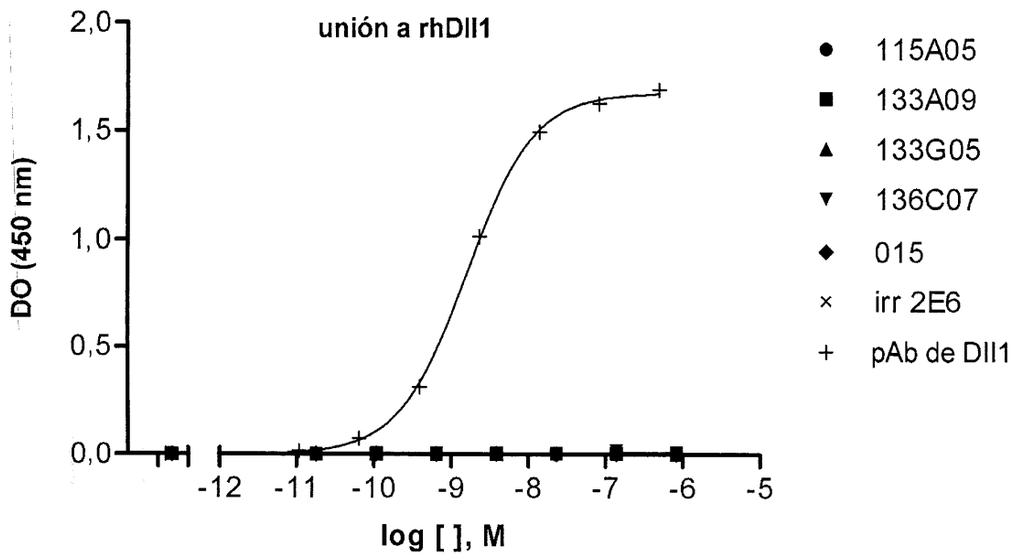

unión a rhDll1
DO (450 nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
irr 2E6
pAb de Dll1

Fig. 13-2

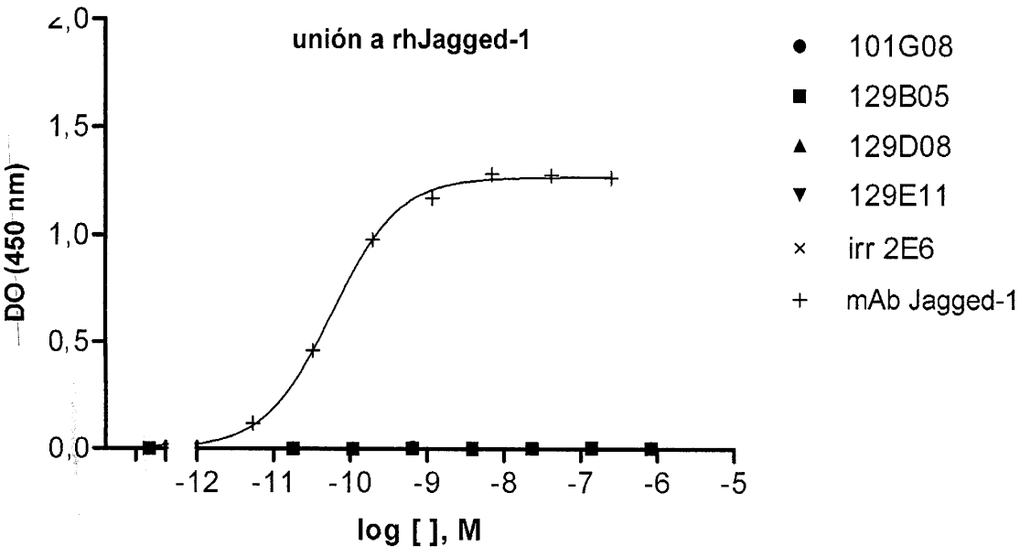

unión a rhJagged-1
DO (450 nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
101G08
129B05
129D08
129E11
irr 2E6
mAb Jagged-1

Fig. 13-3

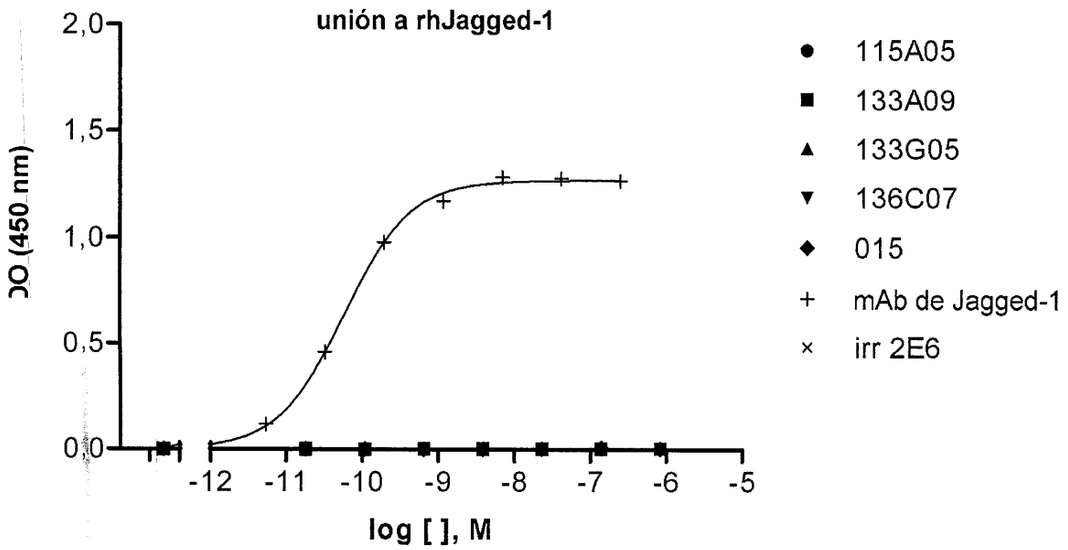

unión a rhJagged-1
DO (450 nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [ ], M
115A05
133A09
133G05
136C07
015
mAb de Jagged-1
irr 2E6

Fig. 13-4

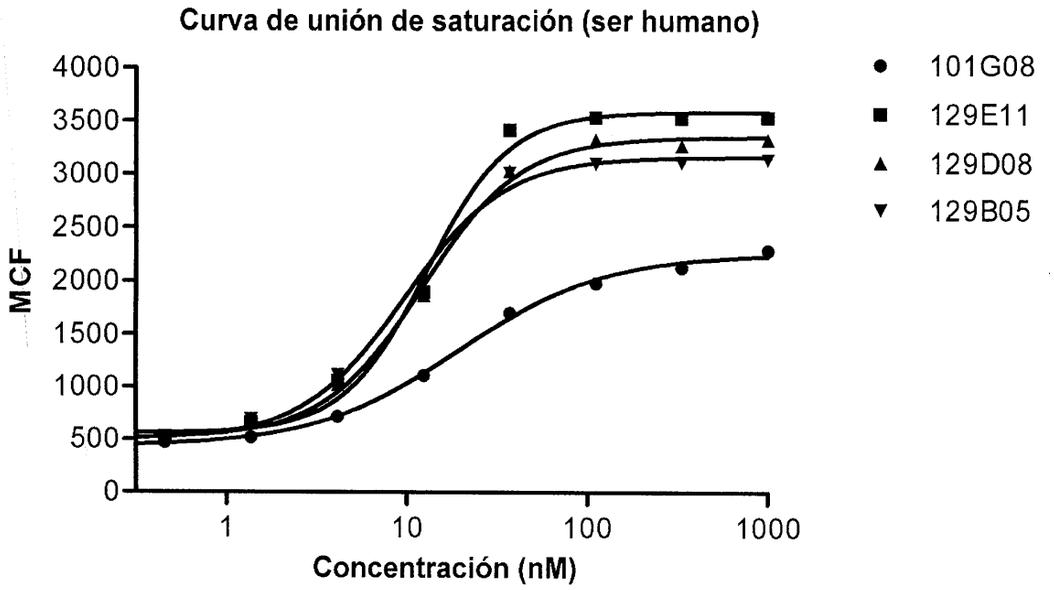

Curva de unión de saturación (ser humano)
MCF
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1
10
100
1000
Concentración (nM)
101G08
129E11
129D08
129B05

Fig. 14-1

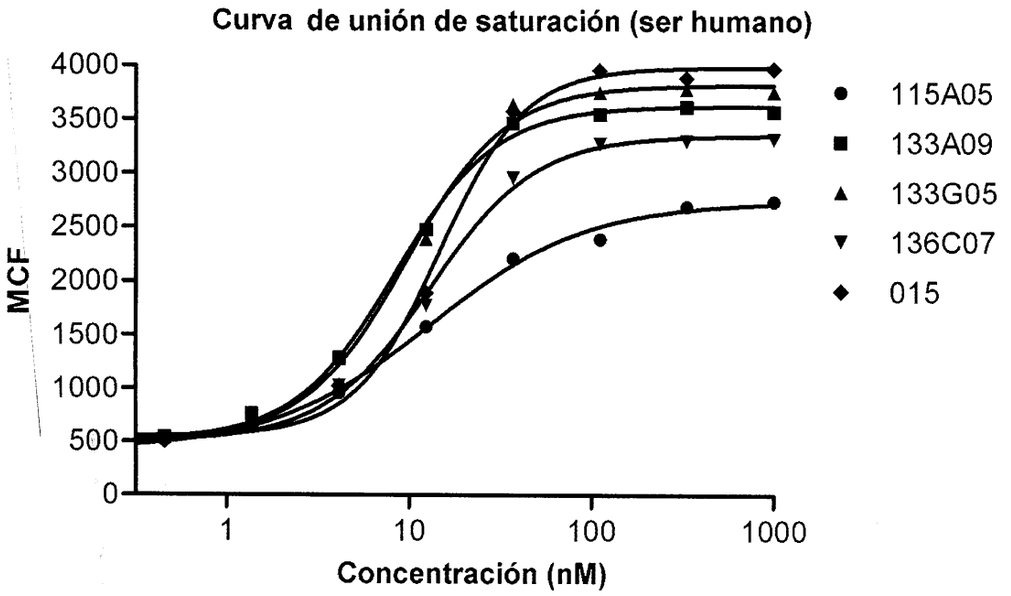

Curva de unión de saturación (ser humano)
MCF
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1
10
100
1000
Concentración (nM)
115A05
133A09
133G05
136C07
015

Fig. 14-2

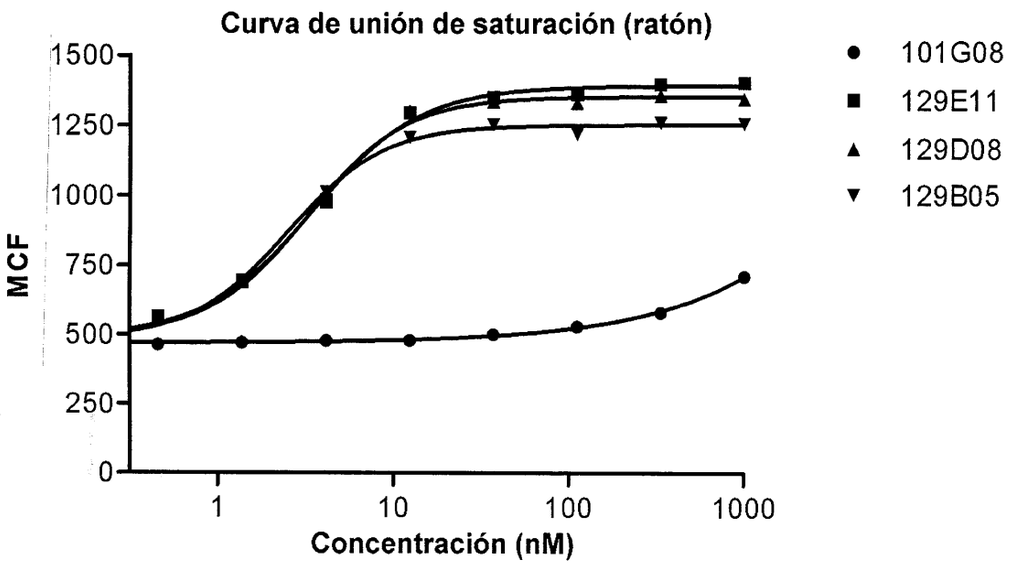


Fig. 14-3

365
3-9-4

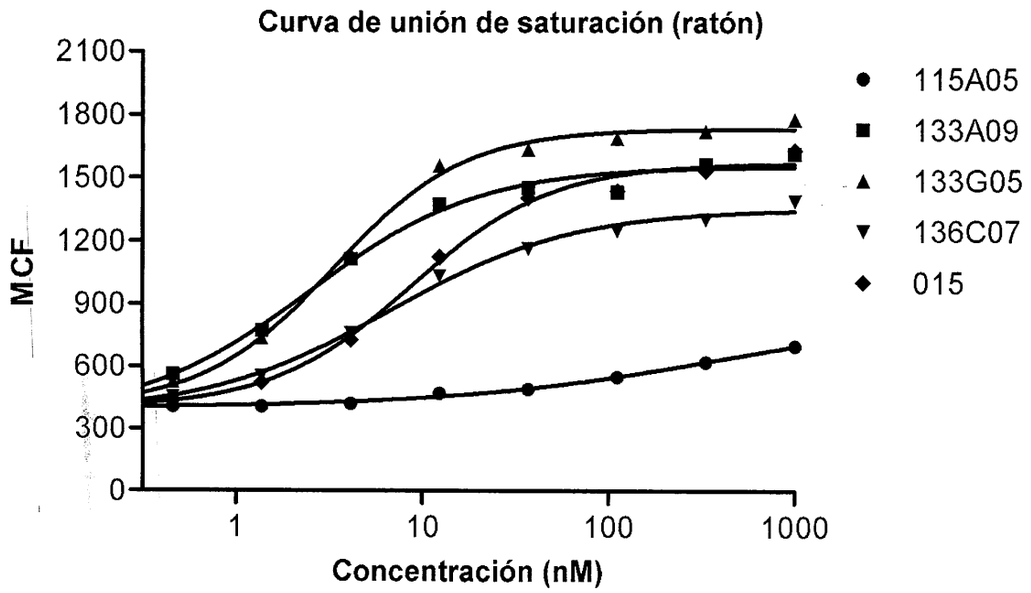

Curva de unión de saturación (ratón)
MCF
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
1
10
100
1000
Concentración (nM)
115A05
133A09
133G05
136C07
015

Fig. 14-4

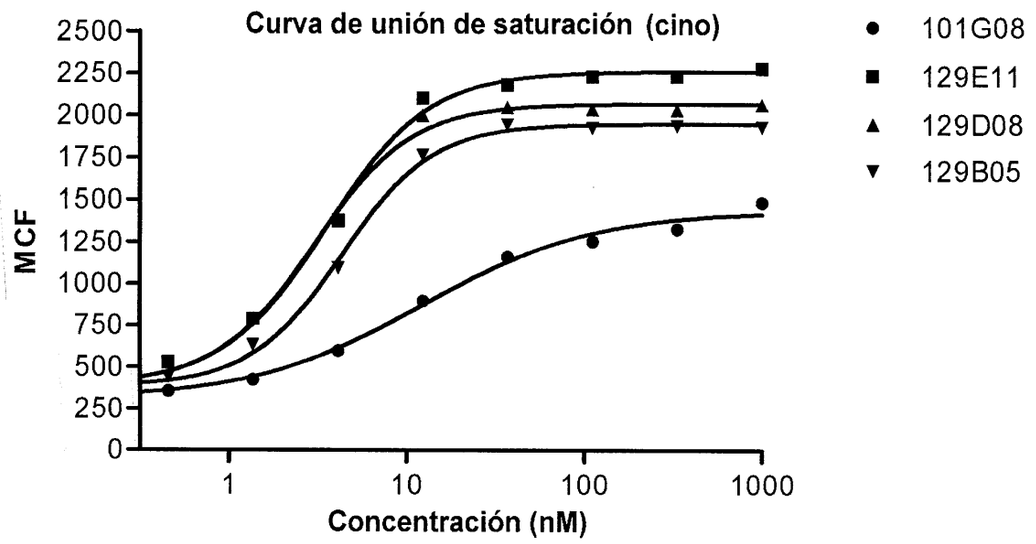

Curva de unión de saturación (cino)
MCF
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
1
10
100
1000
Concentración (nM)
101G08
129E11
129D08
129B05

Fig. 14-5

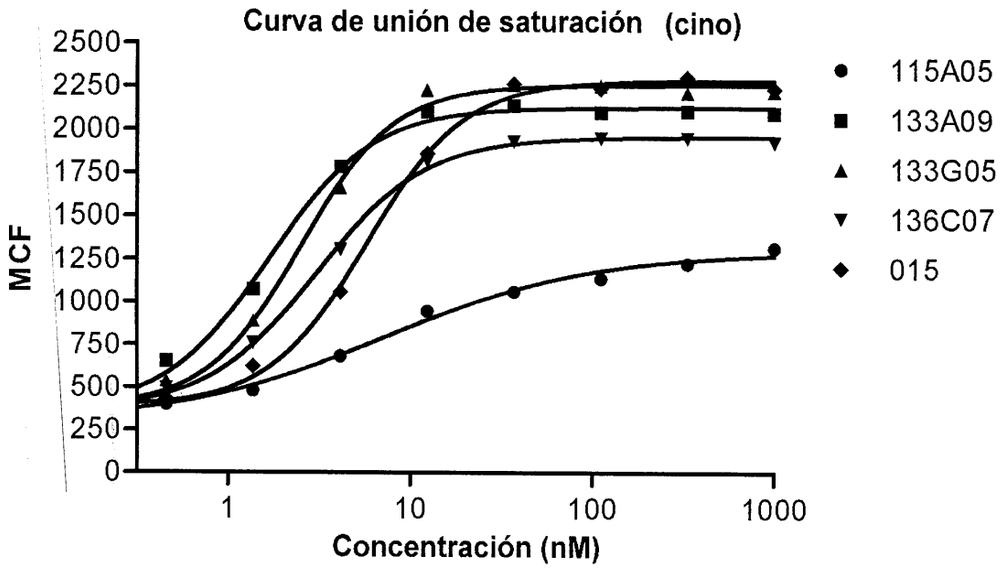

Curva de unión de saturación (cino)
MCF
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
1
10
100
1000
Concentración (nM)
115A05
133A09
133G05
136C07
015

Fig. 14-6

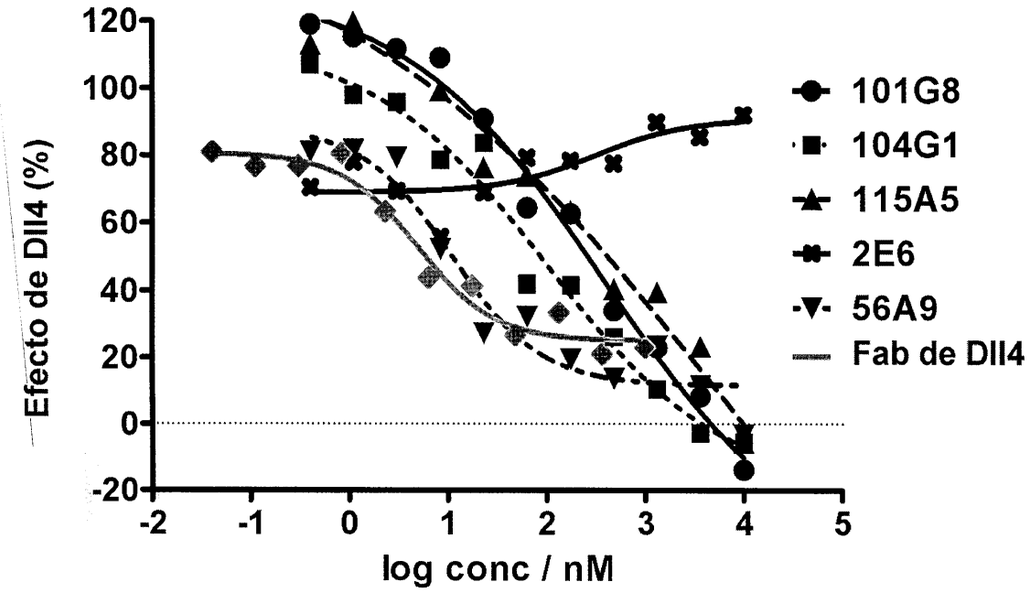
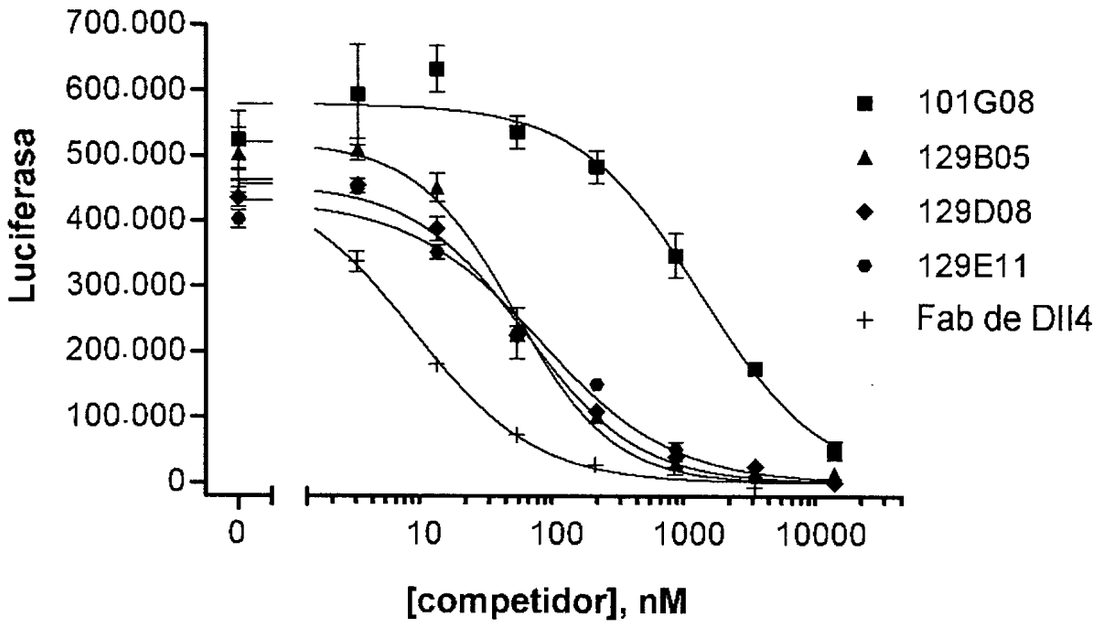

Efecto de Dll4 (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
4
5
log conc / nM
101G8
104G1
115A5
2E6
56A9
Fab de Dll4

Fig. 15

Figura 16-1


700.000
600.000
500.000
400.000
300.000
200.000
100.000
0
Luciferasa
0
10
100
1000
10000
[competidor], nM
101G08
129B05
129D08
129E11
Fab de Dll4

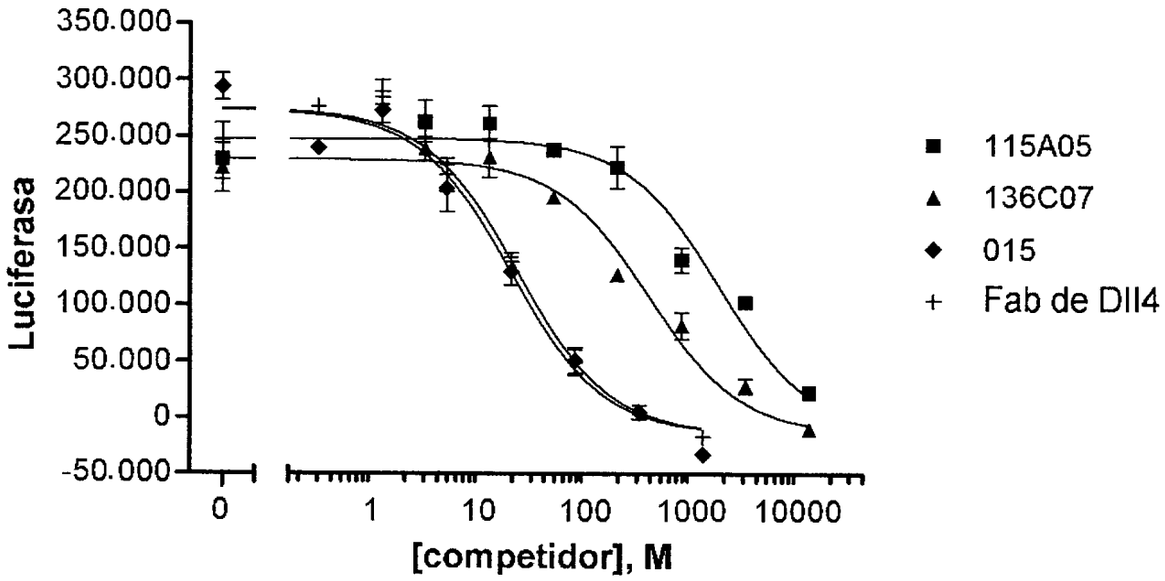
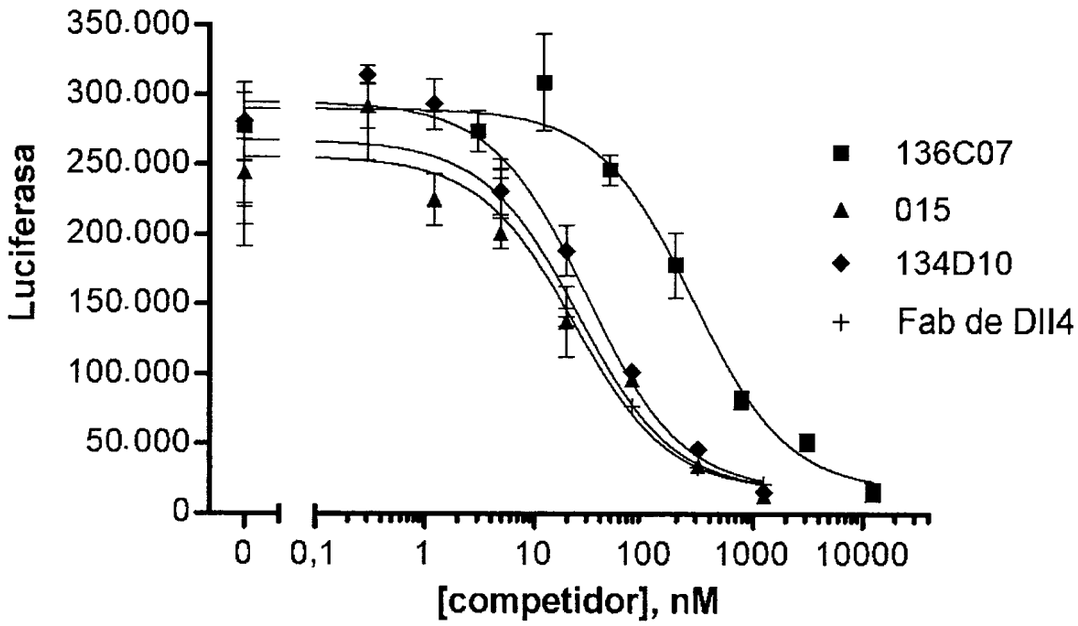
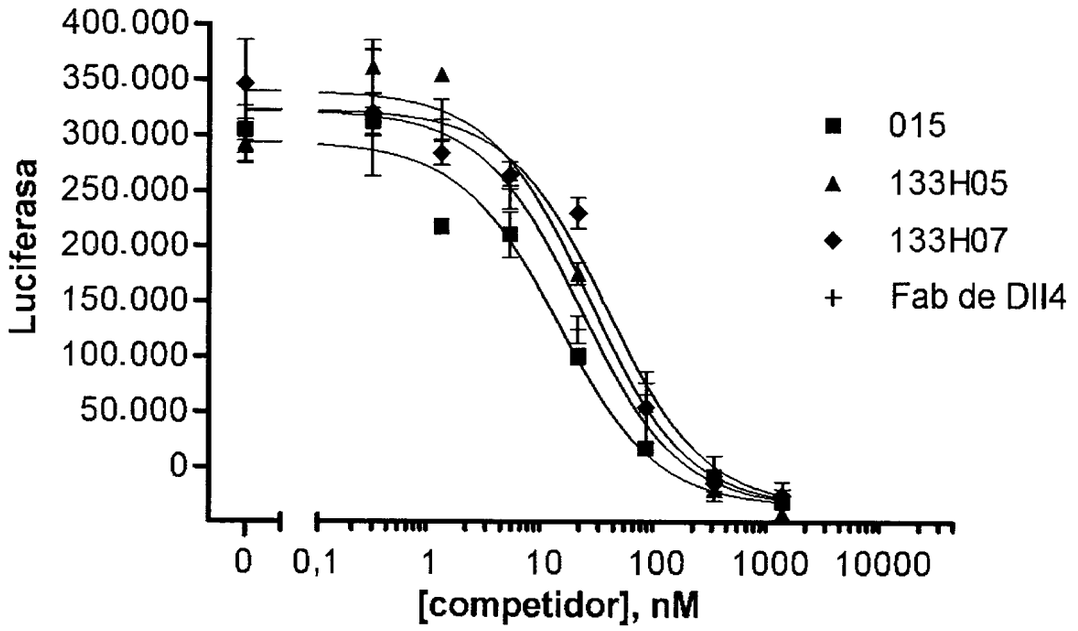

350.000
300.000
250.000
200.000
150.000
100.000
50.000
0
-50.000
Luciferasa
0
1
10
100
1000
10000
[competidor], M
115A05
136C07
015
Fab de Dll4

Figura 16-2

A



B



371
378

A

```
          1       10        20        30        40        50          60
          |        |         |         |         |         |  a       |
Hum VH3 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISSNGGSTYYA
129B05  : .............A............R.......A.Y......ER.Y.A..RWS..TA...

                70        80          90        100             110
                 |         |  abc      |         |abcdef         |
Hum VH3 : DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-------------WGQGTLVTVSS
129B05  : ...Q.........A...V.......KP.........NRAPDTRLAPYEYDH.....Q.....
```

B

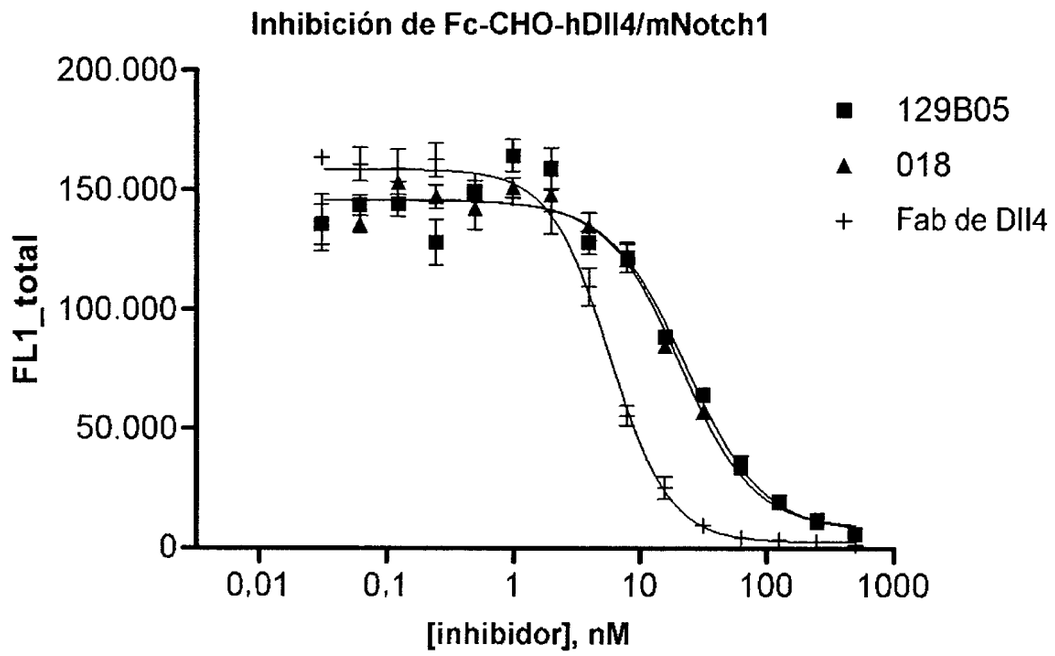
```
          1       10        20        30        40        50          60
          |        |         |         |         |         |  a       |
Hum VH3 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISSNGGSTYYA
136C07  : ............................G..D.....RS....P....S.N.G.......

                70        80          90        100                  110
                 |         |  abc      |         |abcdefghijk          |
Hum VH3 : DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR------------------WGQGTLVTVSS
136C07  : .Y...........A...........KP.........ADRYIWARQGEYWGAYEYDY.....Q.....
```

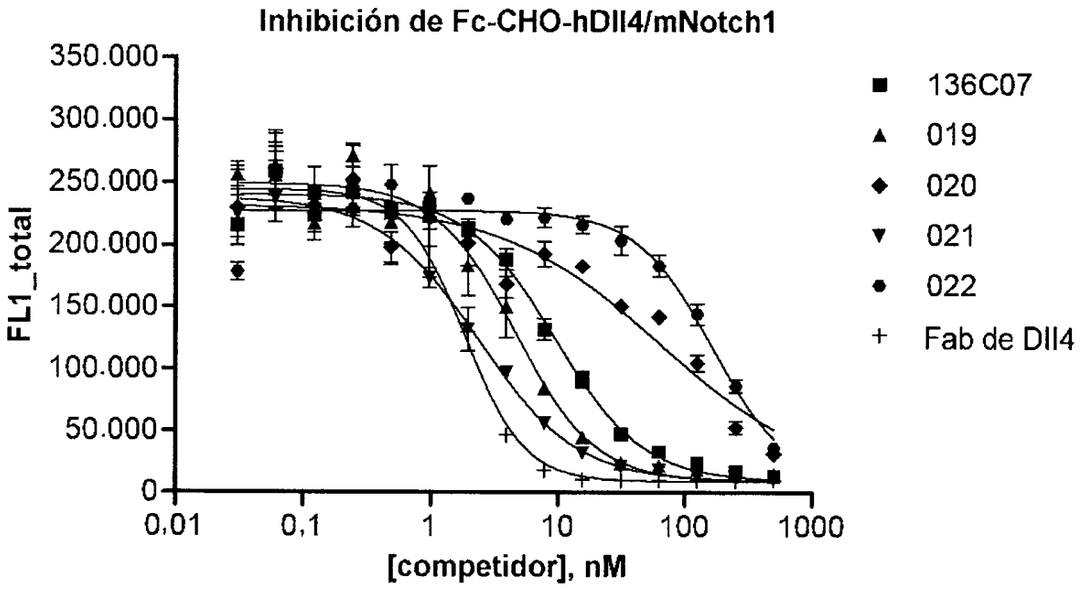
Figura 17

Figura 18-1

A



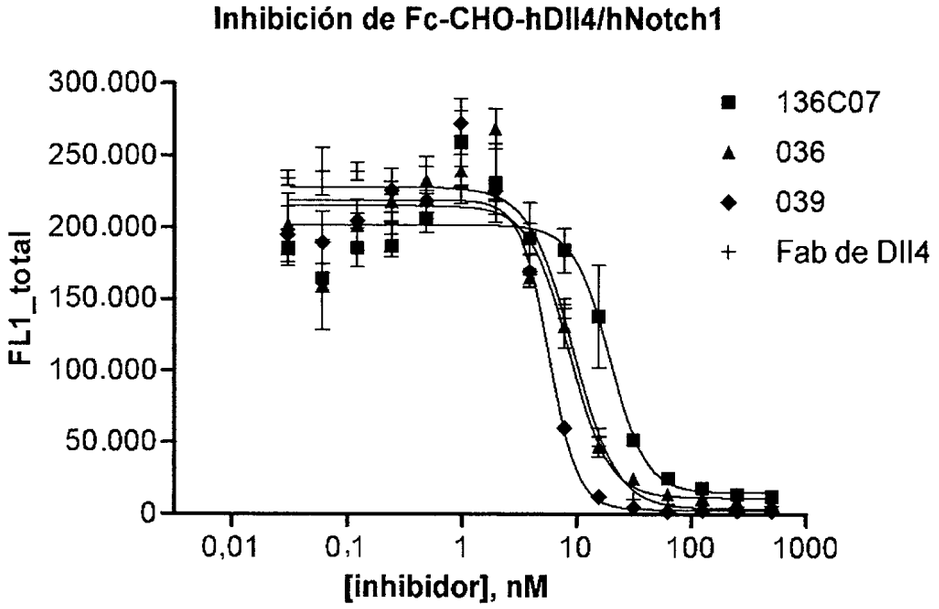
B-1



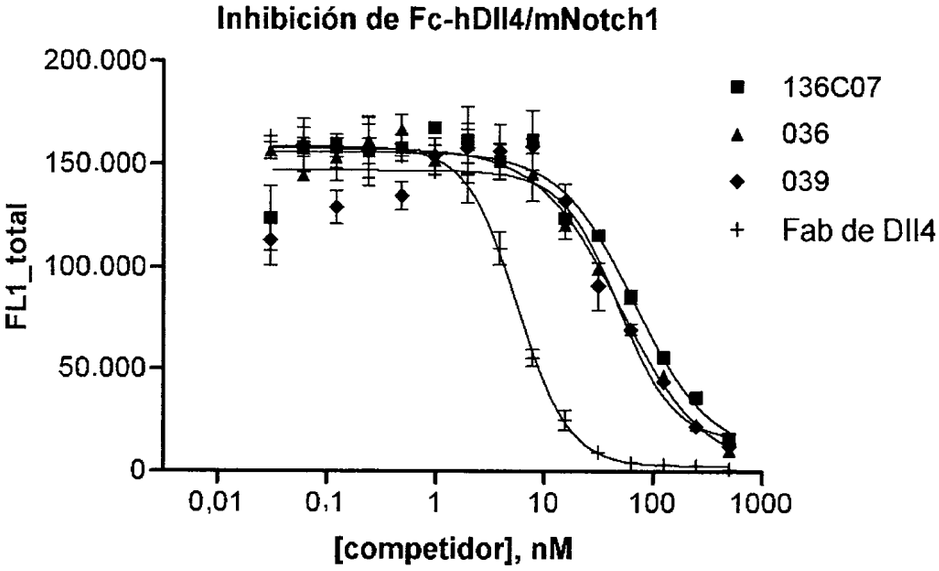
373
372

Figura 18-2

B-2

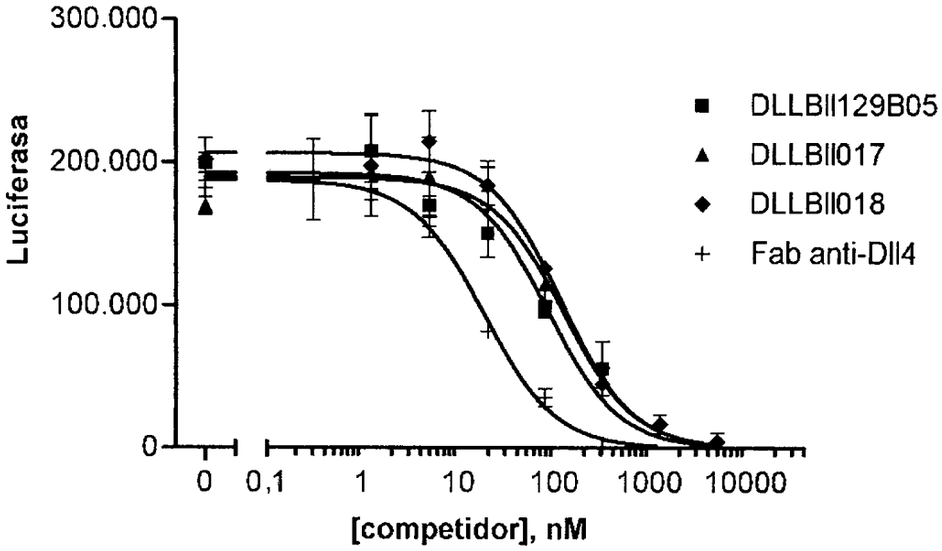


B-3



374
373

Figura 19


300.000
200.000
100.000
0
Luciferasa
0
0,1
1
10
100
1000
10000
[competidor], nM
DLLBII129B05
DLLBII017
DLLBII018
Fab anti-DII4

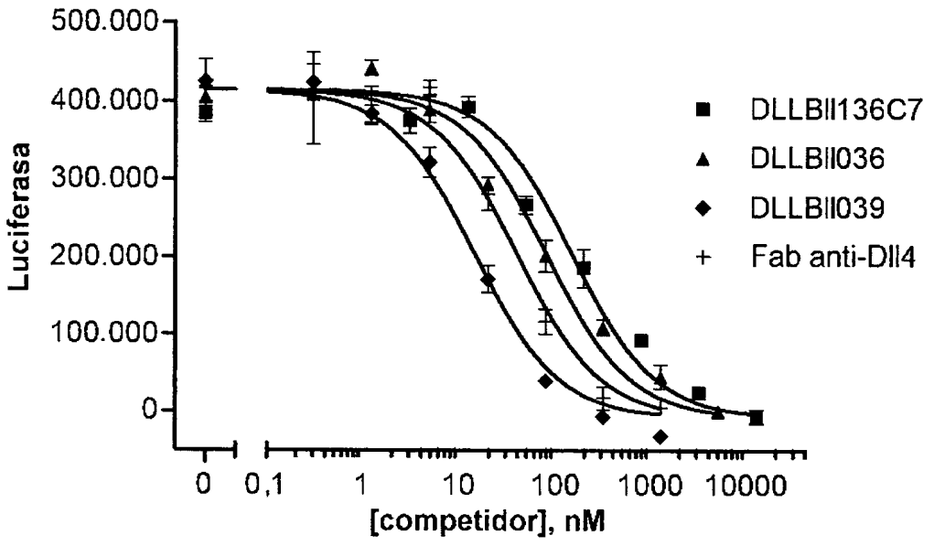

500.000
400.000
300.000
200.000
100.000
0
Luciferasa
0
0,1
1
10
100
1000
10000
[competidor], nM
DLLBII136C7
DLLBII036
DLLBII039
Fab anti-DII4

Figura 20

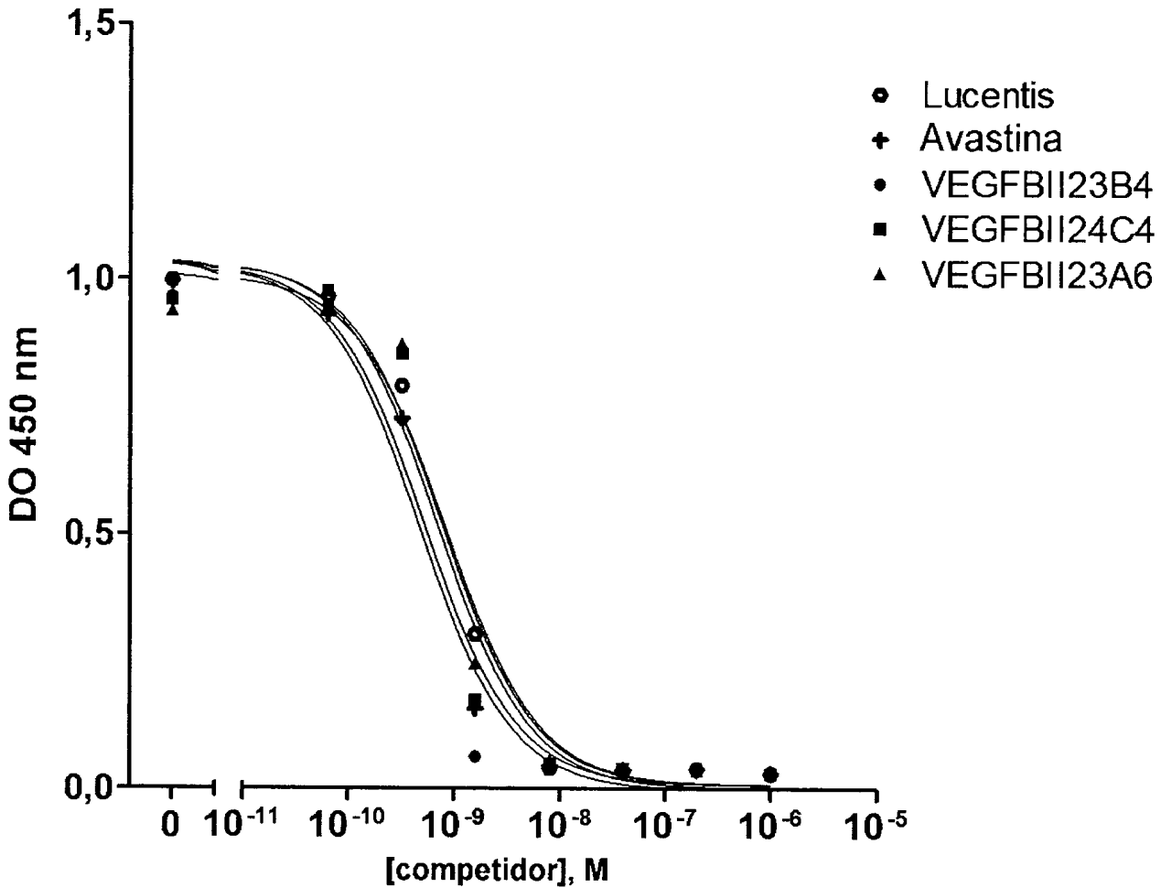
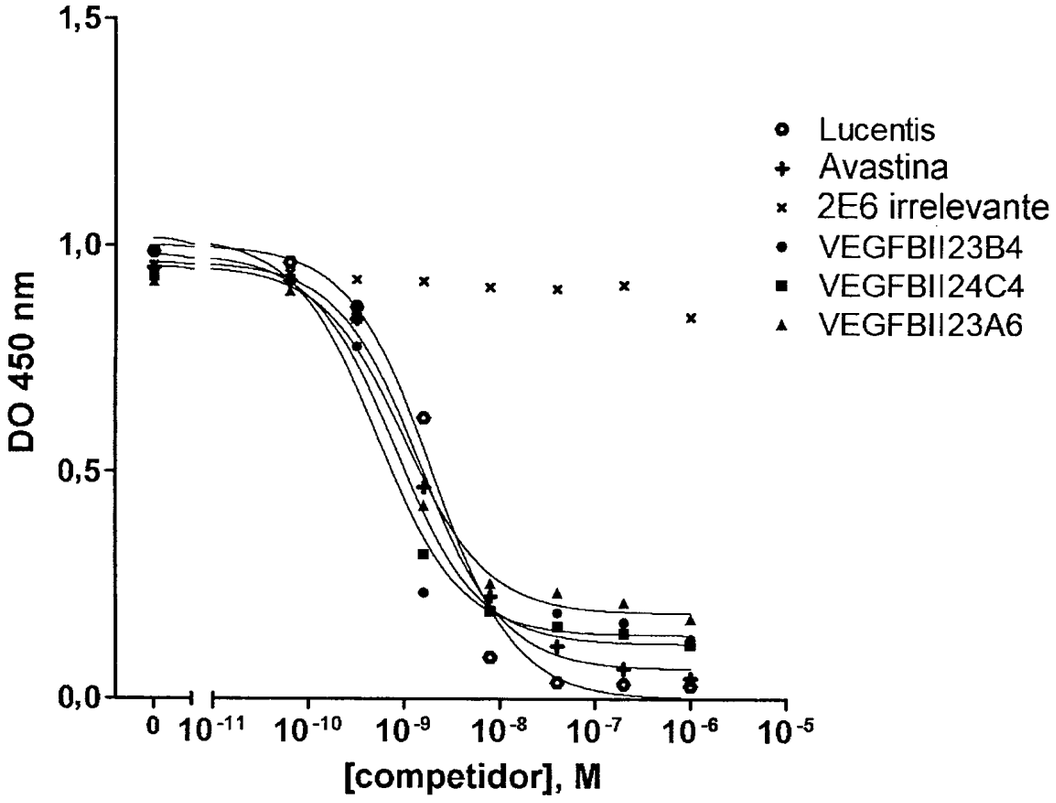

1,5
1,0
0,5
0,0
DO 450 nm
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[competidor], M
Lucentis
Avastina
VEGFBII23B4
VEGFBII24C4
VEGFBII23A6

Figura 21



377
376

Figura 22

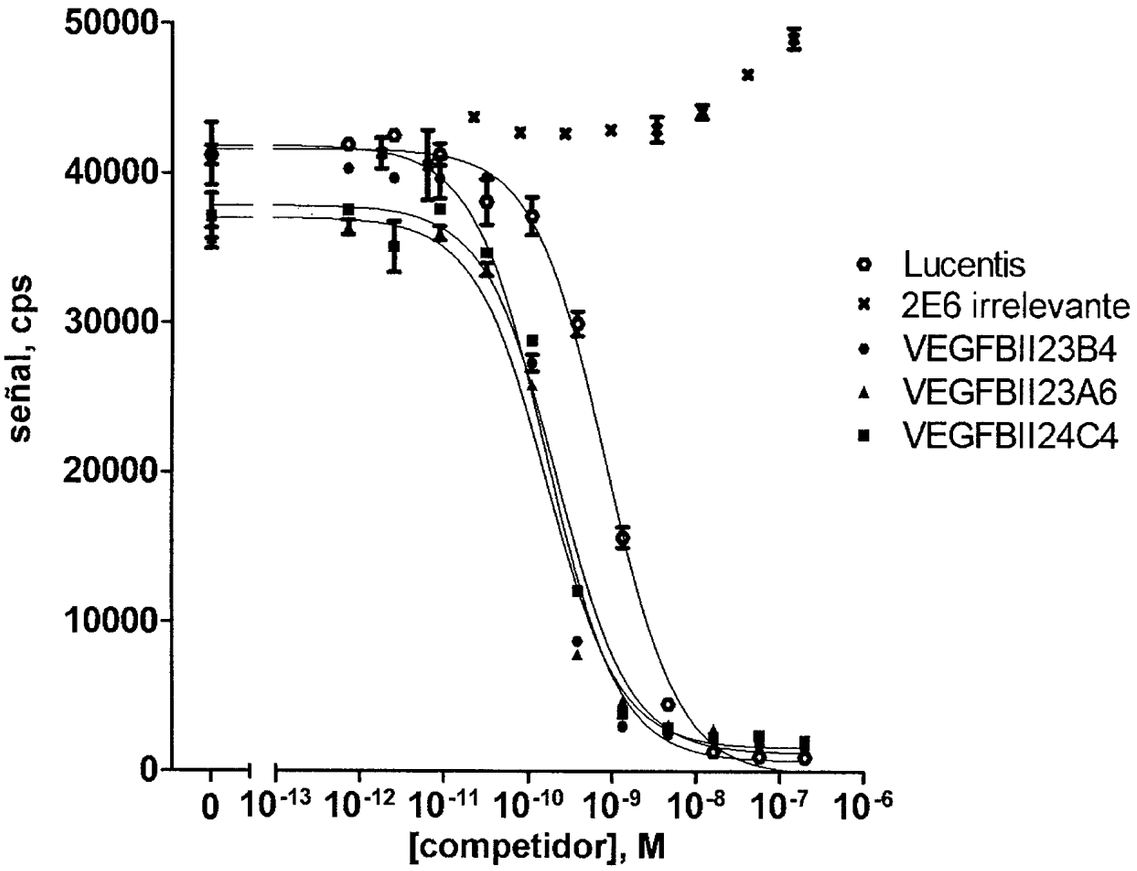
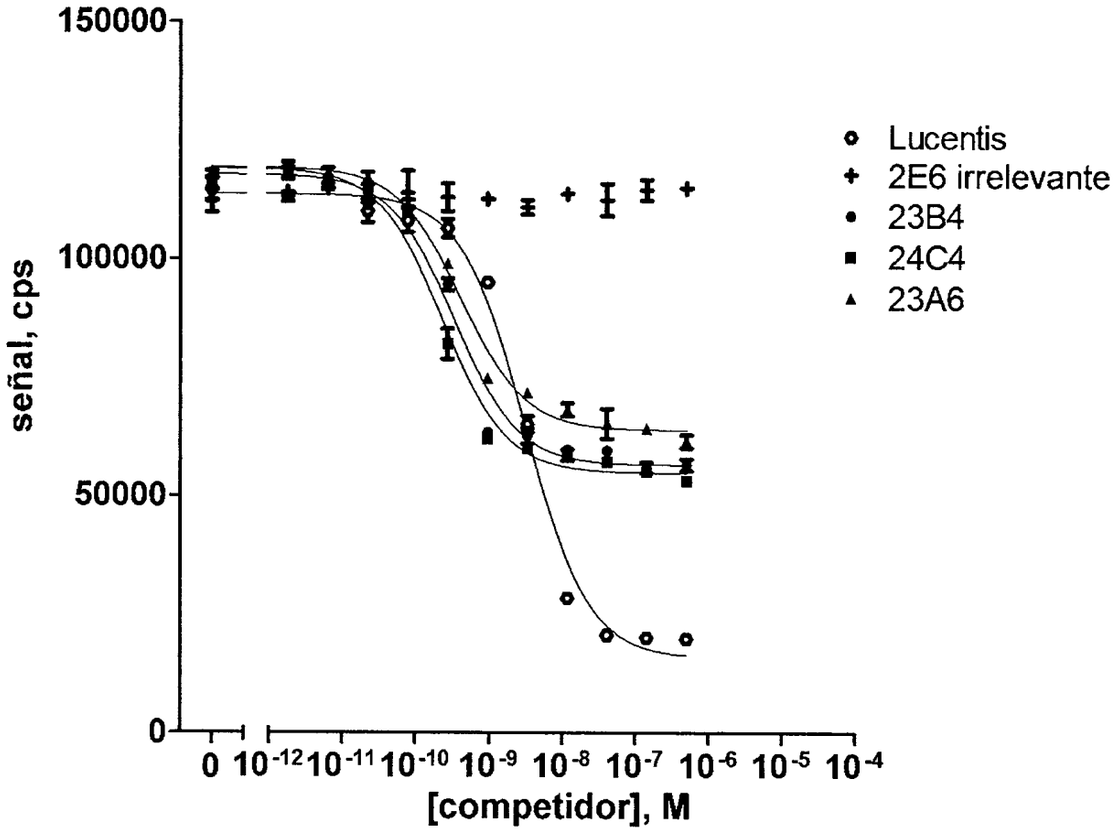
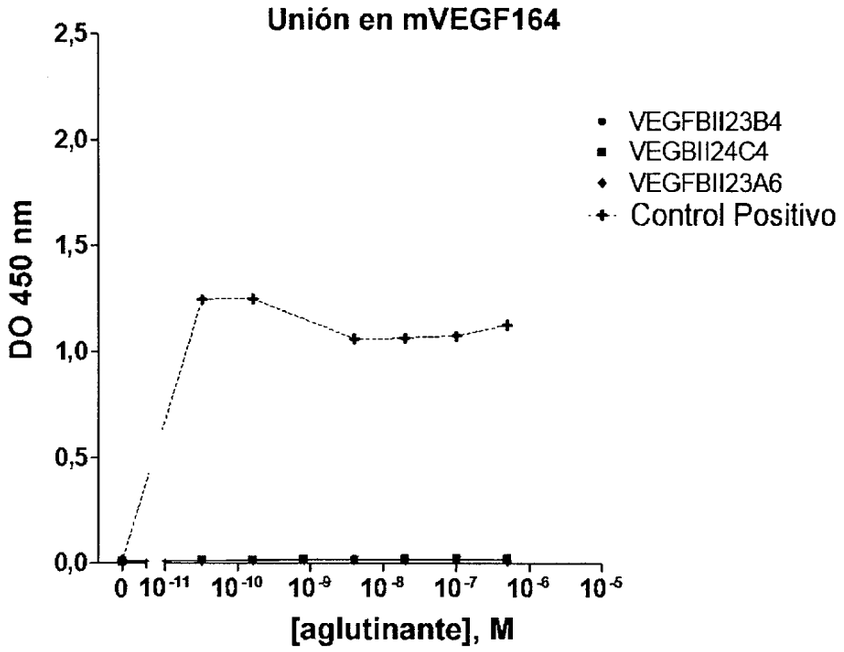

50000
40000
30000
20000
10000
0
señal, cps
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competidor], M
Lucentis
2E6 irrelevante
VEGFBII23B4
VEGFBII23A6
VEGFBII24C4

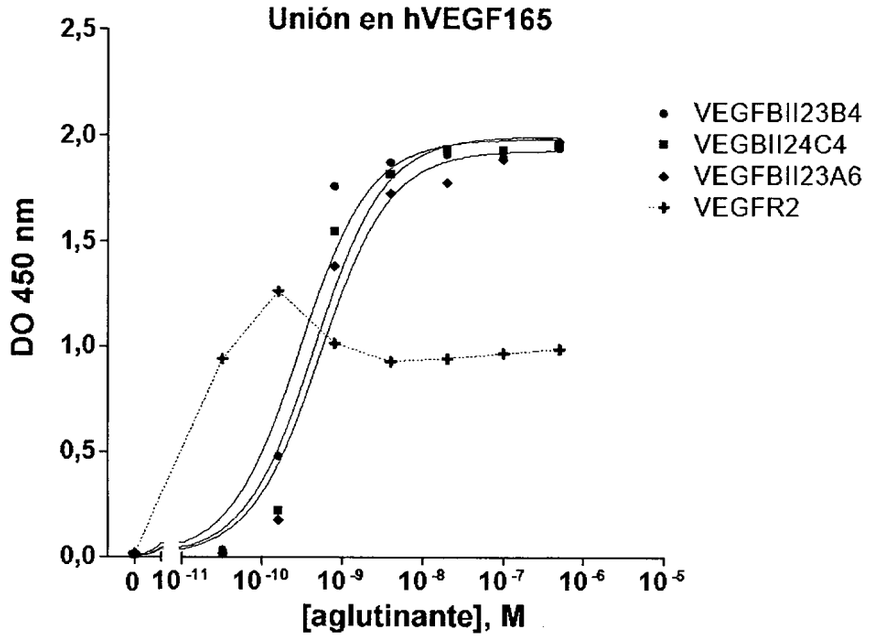
Figura 23



379
378

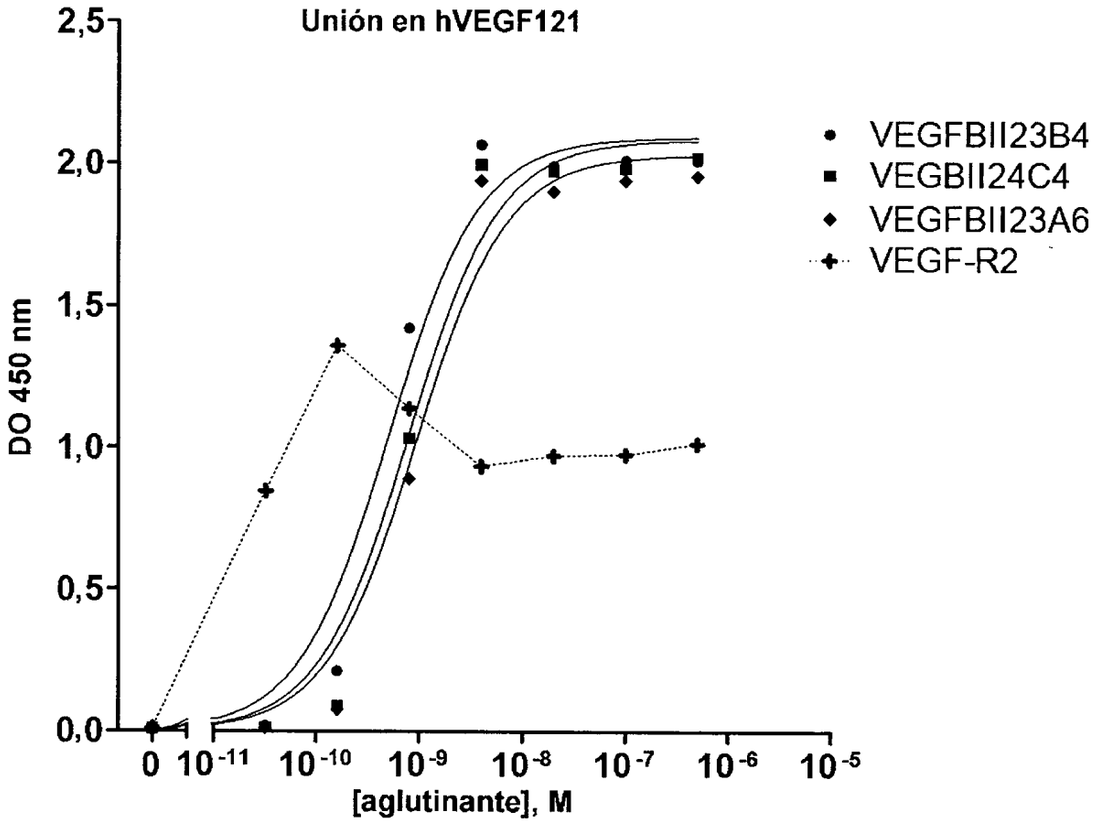
Figura 24





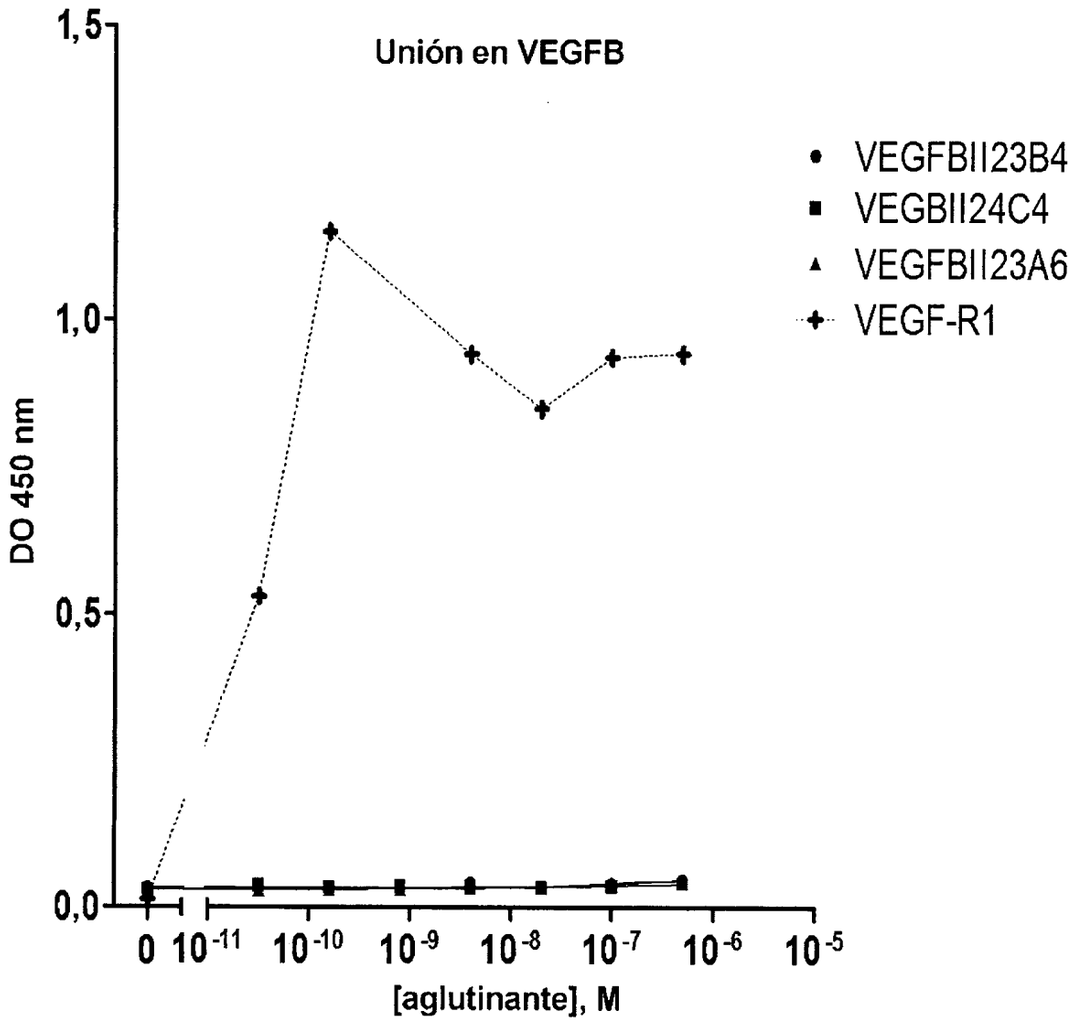
3DCS
7399

Figura 25



381
380

Figura 26-1



382
381

Figura 26-2

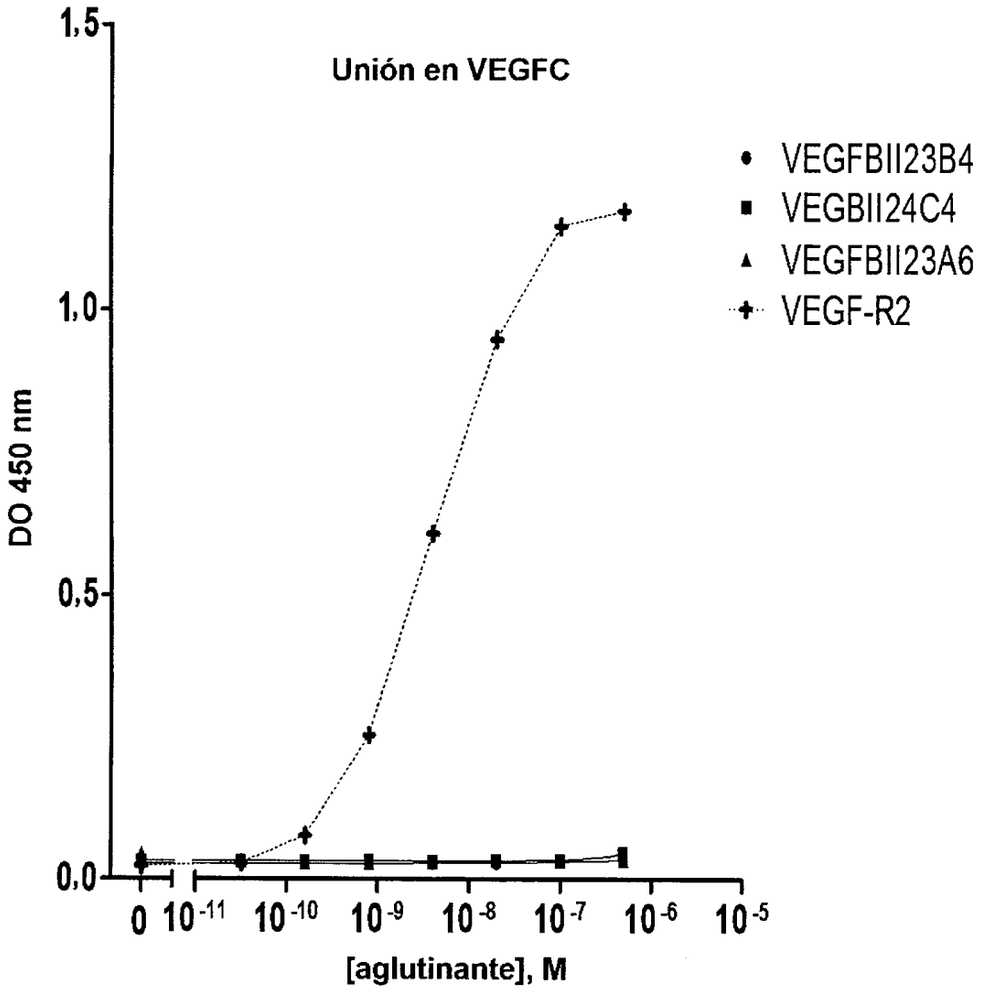

Unión en VEGFC
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGF-R2
DO 450 nm
1,5
1,0
0,5
0,0
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[aglutinante], M

Figura 26-3

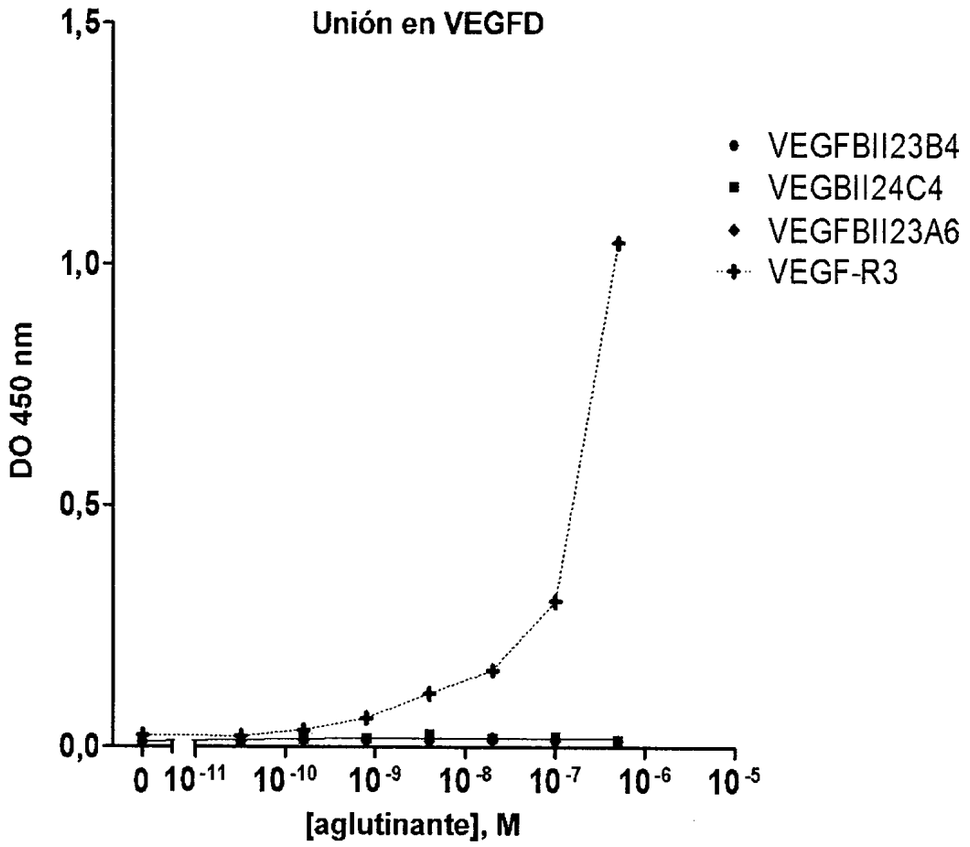

Unión en VEGFD
1,5
1,0
0,5
0,0
DO 450 nm
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[aglutinante], M
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGF-R3

Figura 26-4

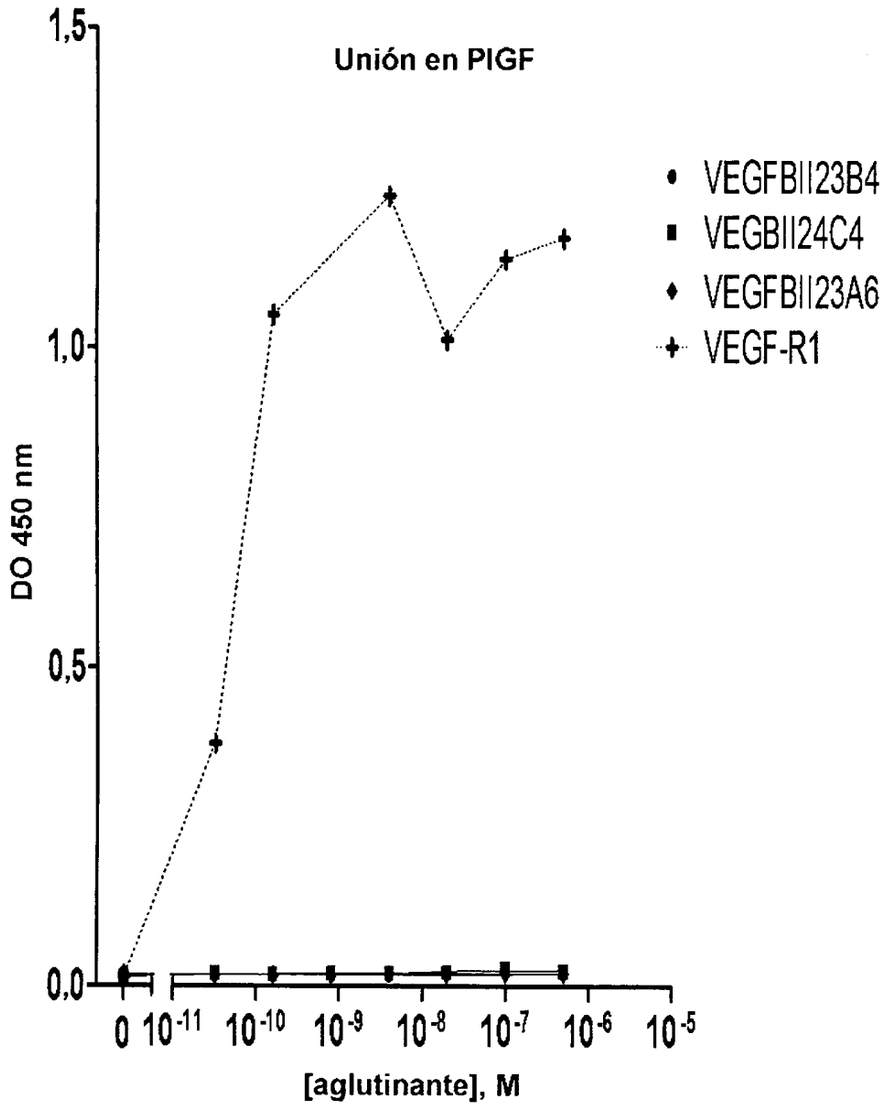
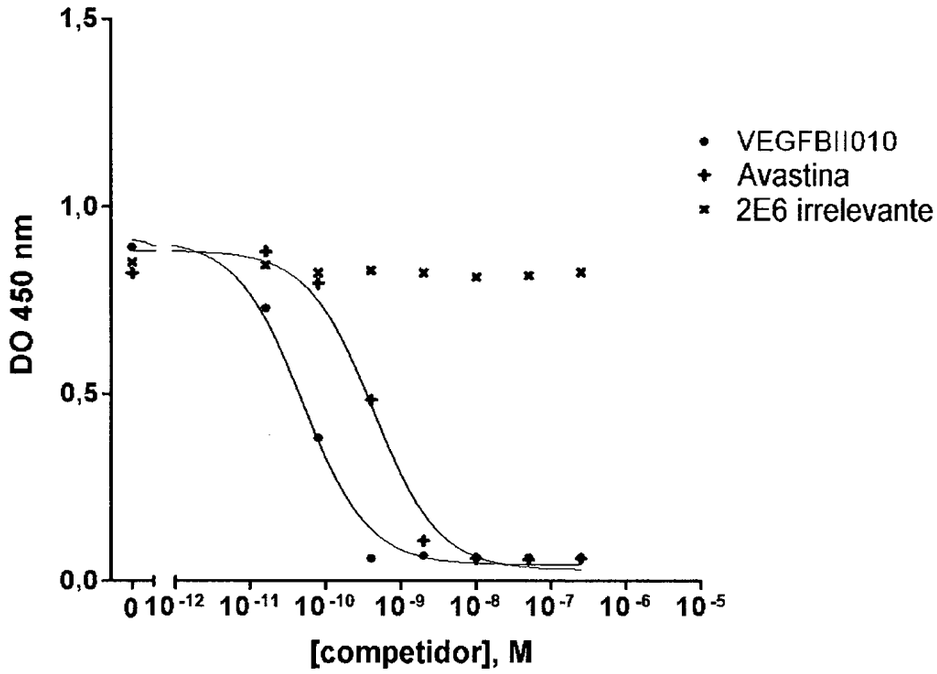

Unión en PlGF
VEGFBII23B4
VEGBII24C4
VEGFBII23A6
VEGF-R1
DO 450 nm
1,5
1,0
0,5
0,0
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[aglutinante], M

Figura 27


1,5
1,0
0,5
0,0
DO 450 nm
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[competidor], M
VEGFBII010
Avastina
2E6 irrelevante

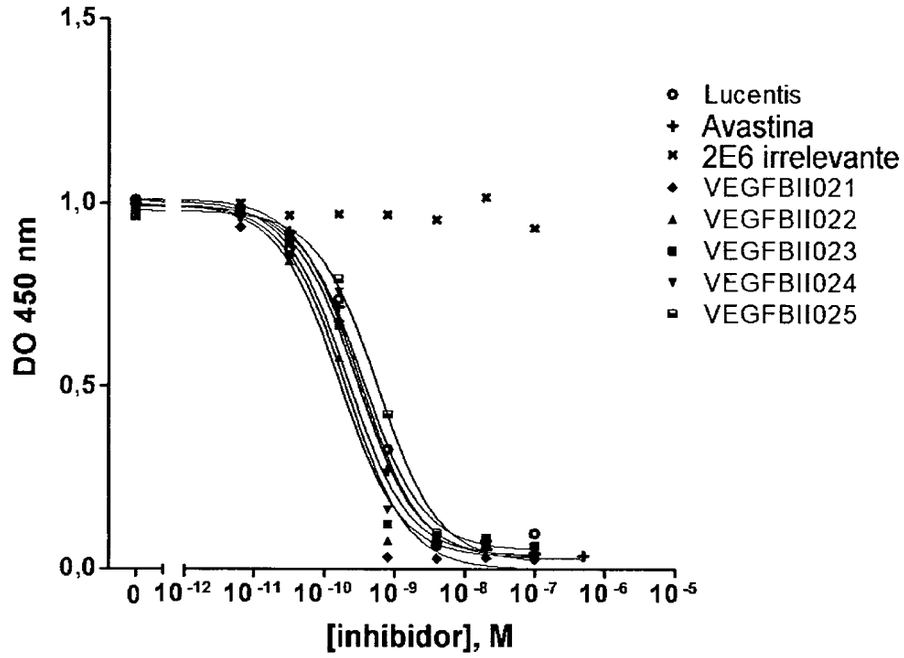
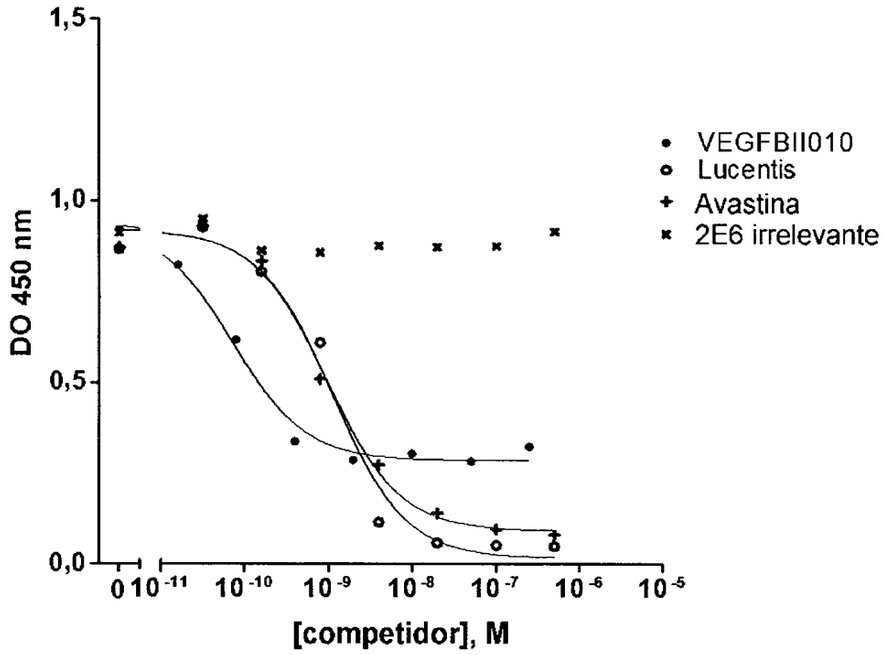

1,5
1,0
0,5
0,0
DO 450 nm
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[inhibidor], M
Lucentis
Avastina
2E6 irrelevante
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

Figura 28


1,5
1,0
0,5
0,0
DO 450 nm
0 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[competidor], M
VEGFBII010
Lucentis
Avastina
2E6 irrelevante

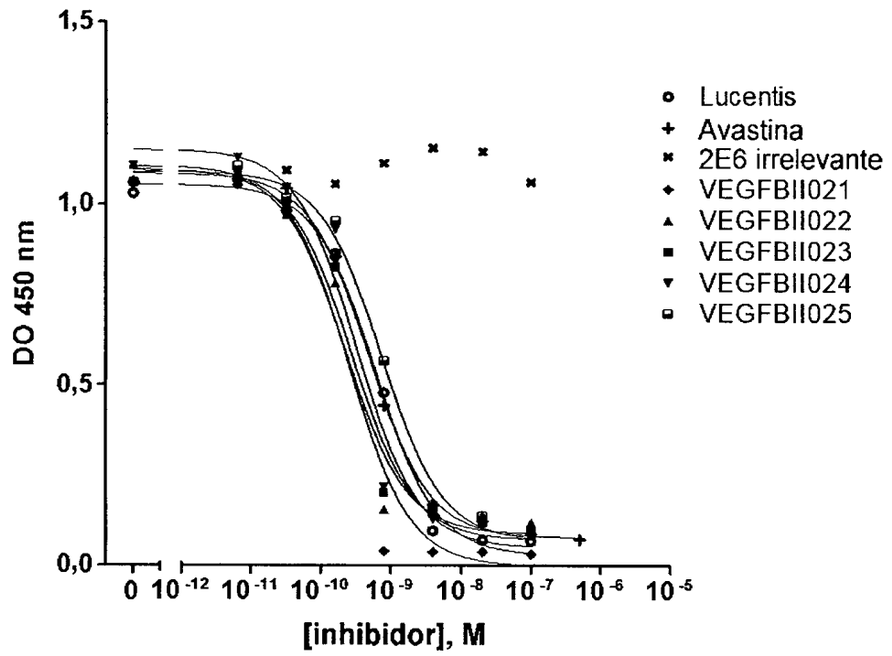

1,5
1,0
0,5
0,0
DO 450 nm
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[inhibidor], M
Lucentis
Avastina
2E6 irrelevante
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

Figura 29

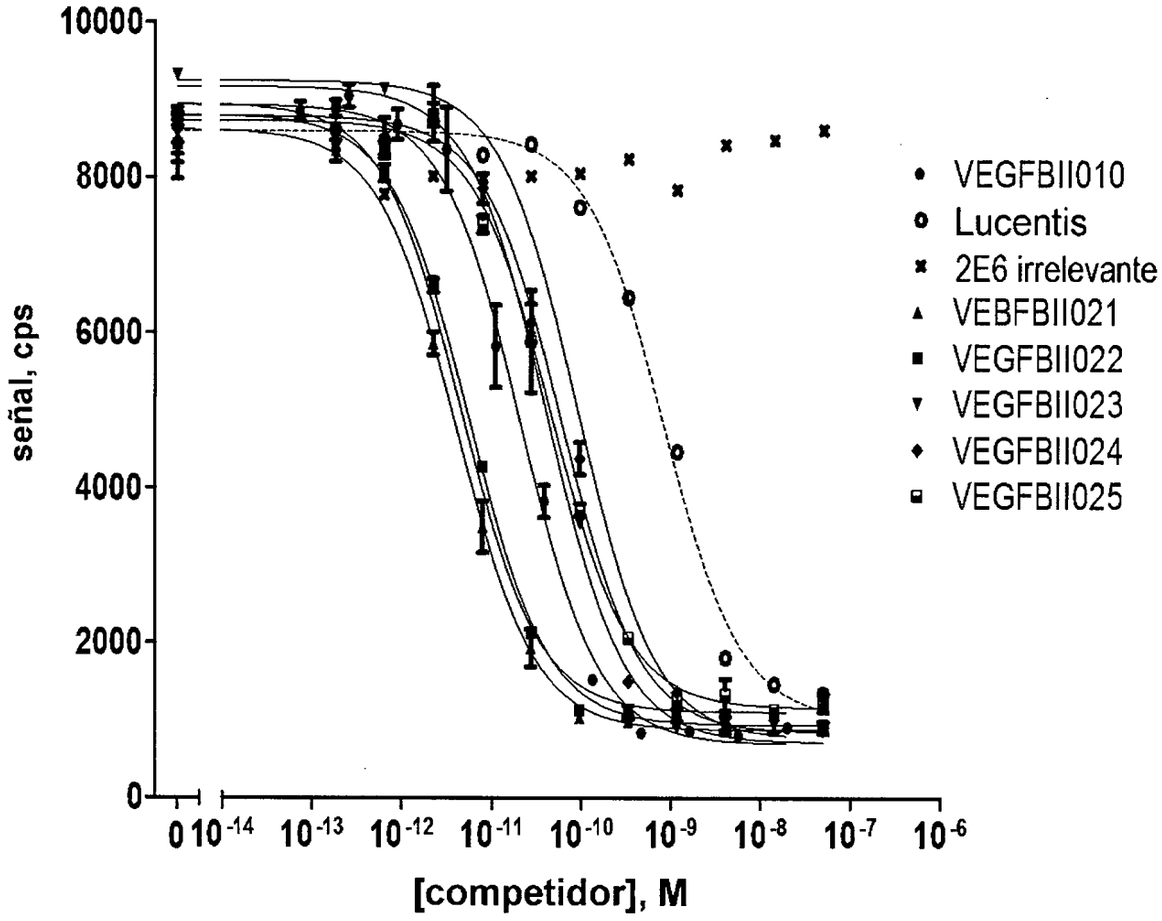

10000
8000
6000
4000
2000
0
señal, cps
0 10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competidor], M
VEGFBII010
Lucentis
2E6 irrelevante
VEBFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

Figura 30

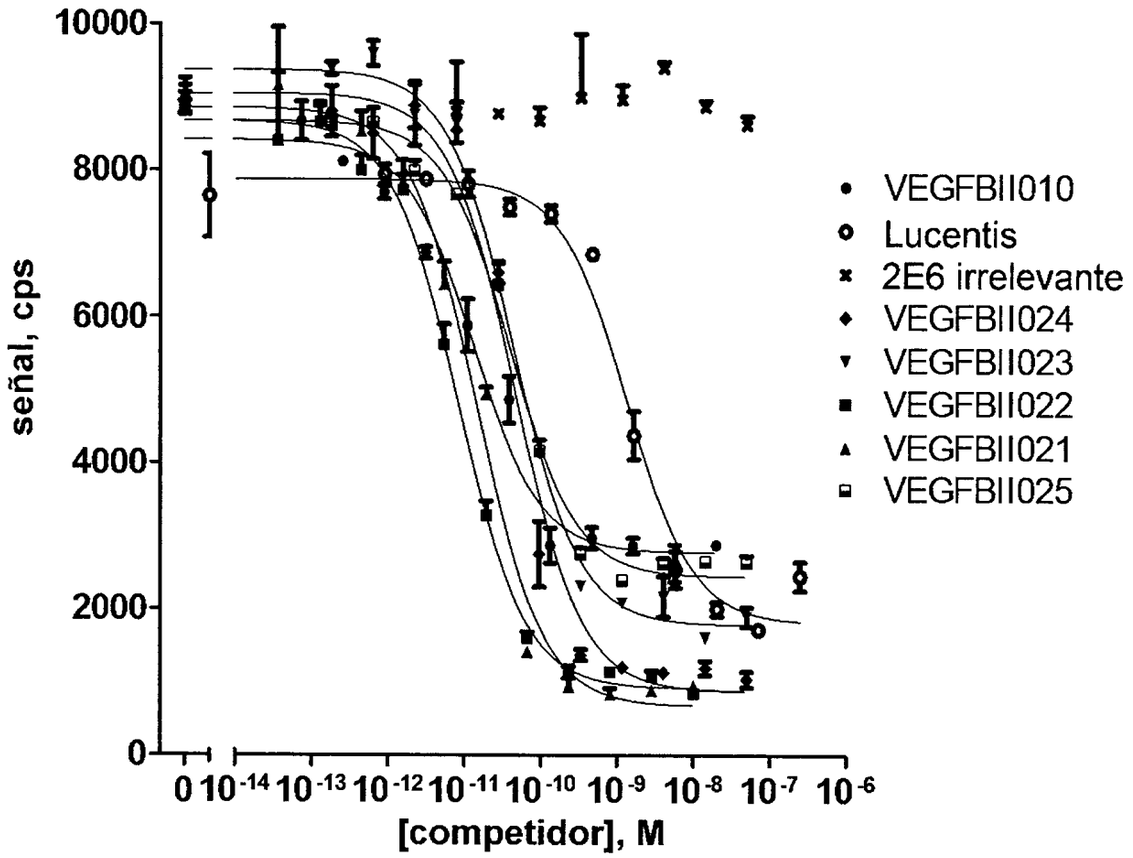
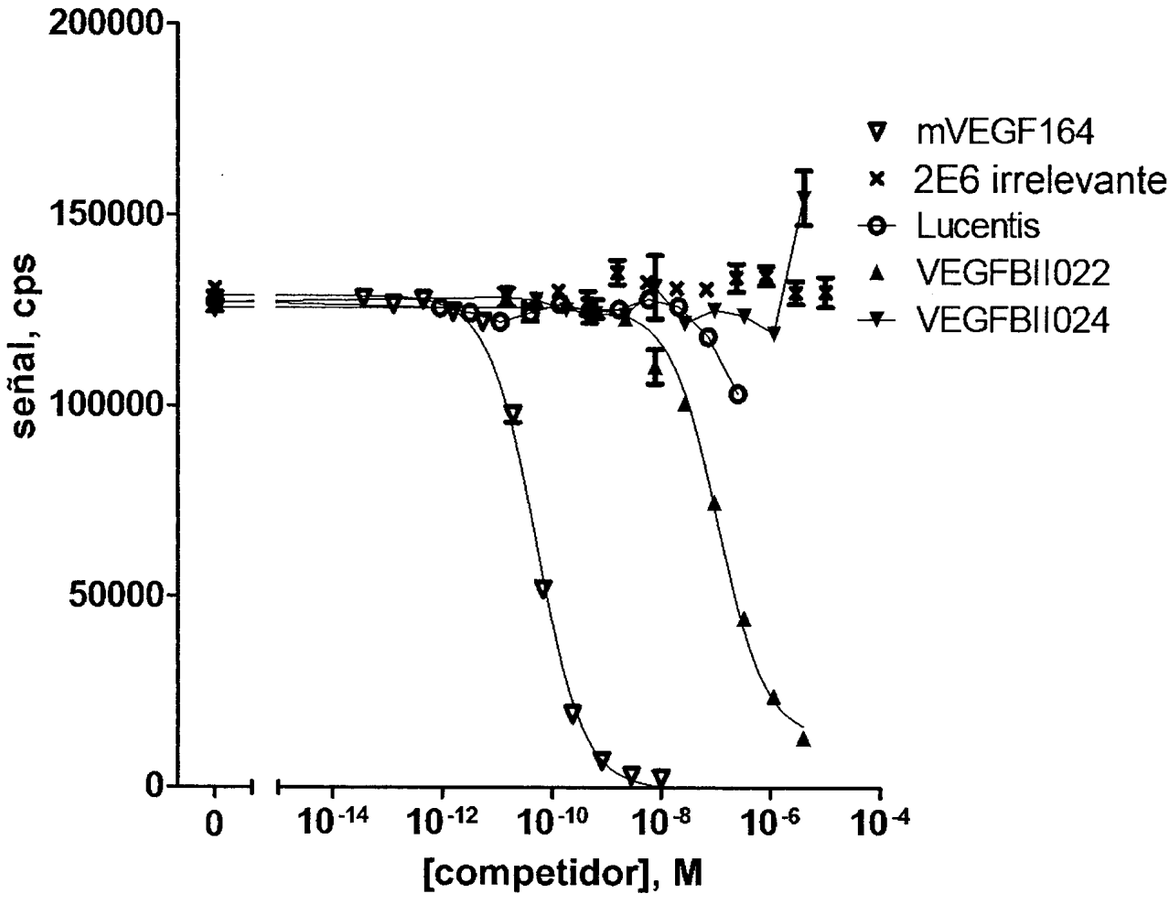
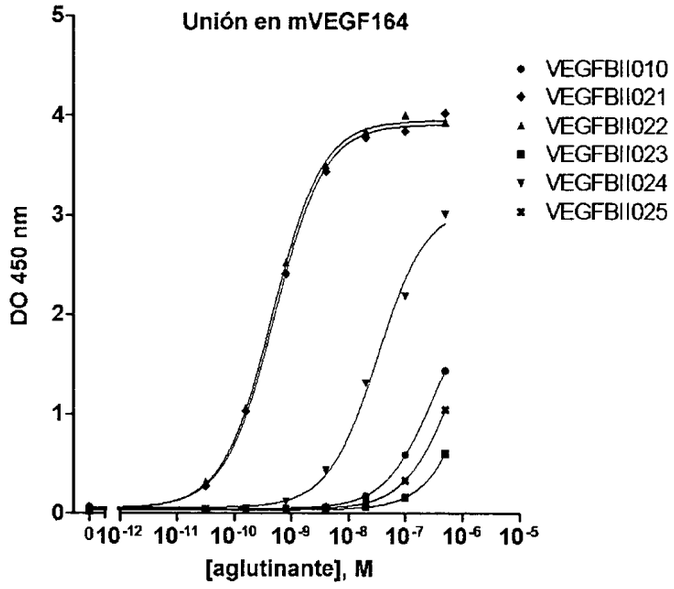

10000
8000
6000
4000
2000
0
señal, cps
0 10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[competidor], M
VEGFBII010
Lucentis
2E6 irrelevante
VEGFBII024
VEGFBII023
VEGFBII022
VEGFBII021
VEGFBII025

Figura 31



378
-389

Figura 32


Unión en mVEGF164
DO 450 nm
[aglutinante], M
VEGFBII010
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

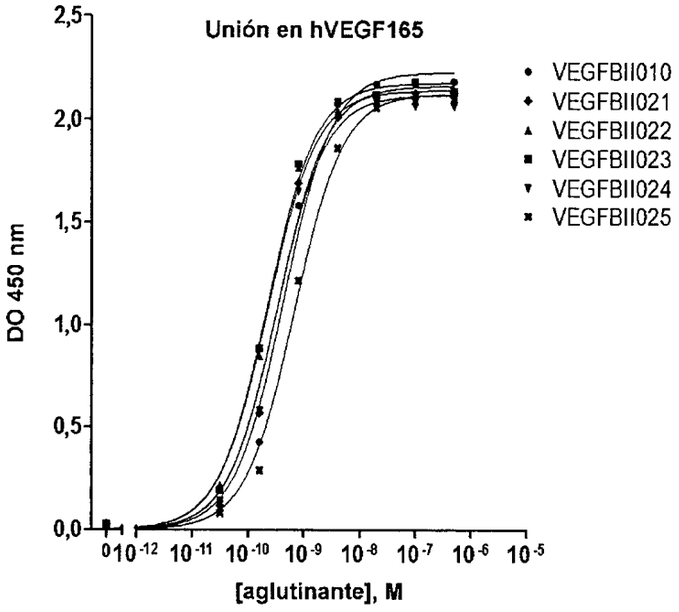
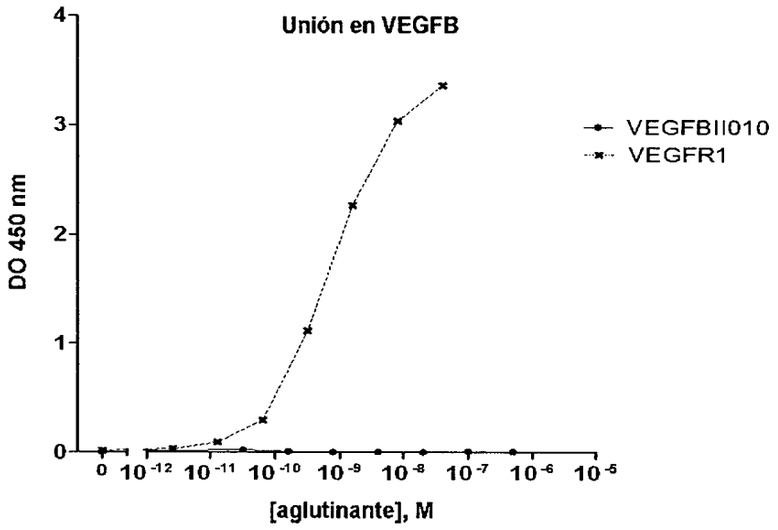

Unión en hVEGF165
DO 450 nm
[aglutinante], M
VEGFBII010
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025

Figura 33-1


Unión en VEGFB
DO 450 nm
4
3
2
1
0
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M
VEGFBII010
VEGFR1

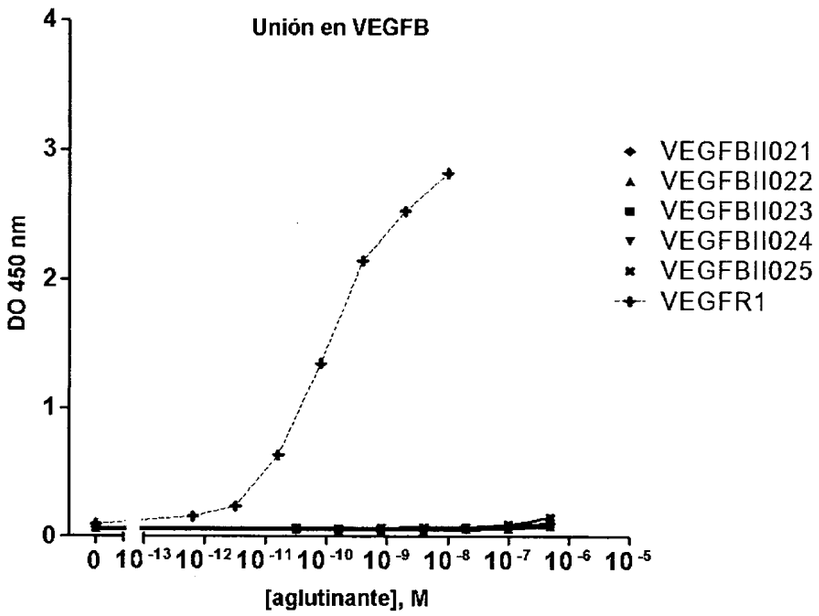
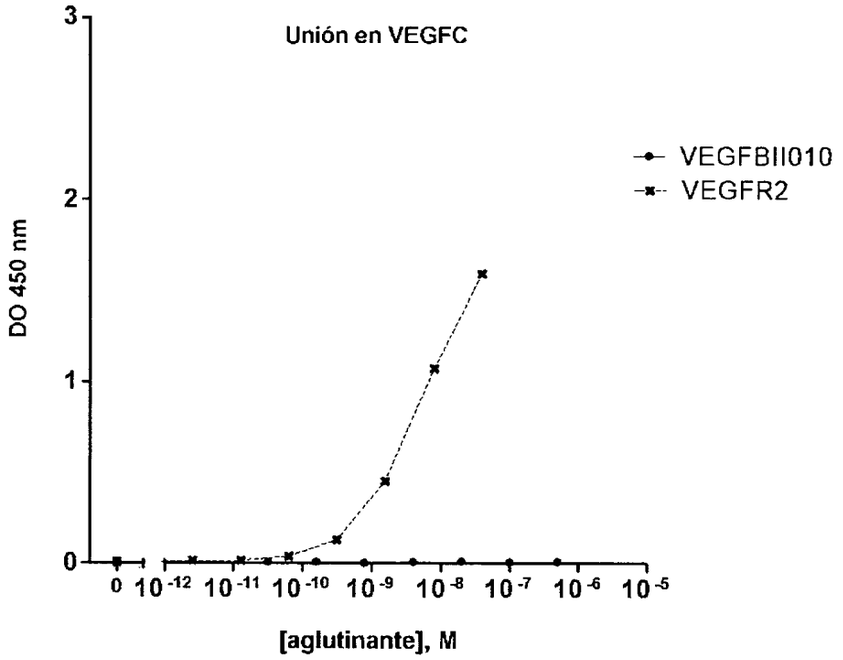

Unión en VEGFB
DO 450 nm
4
3
2
1
0
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
VEGFR1

Figura 33-2


Unión en VEGFC
VEGFBII010
VEGFR2
DO 450 nm
3
2
1
0
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M

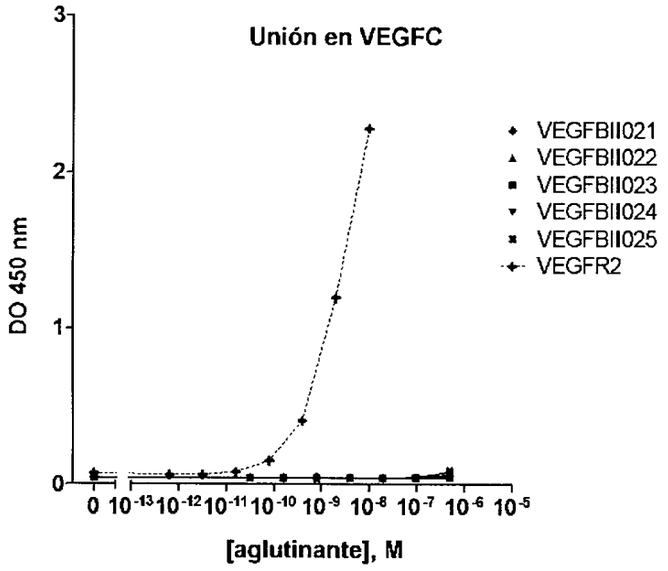
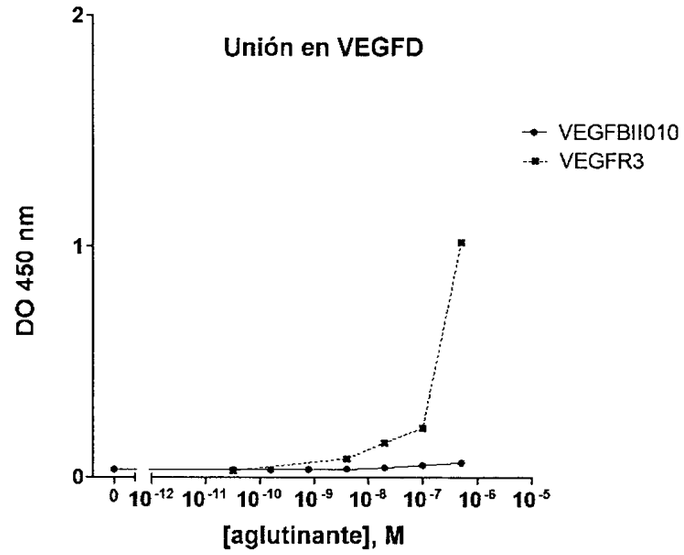

Unión en VEGFC
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
VEGFR2
DO 450 nm
3
2
1
0
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M

Figura 33-3


Unión en VEGFD
VEGFBII010
VEGFR3
DO 450 nm
2
1
0
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M

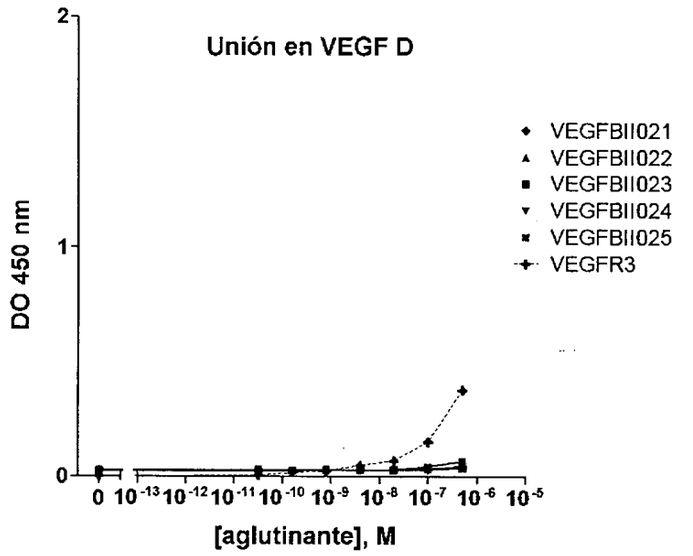
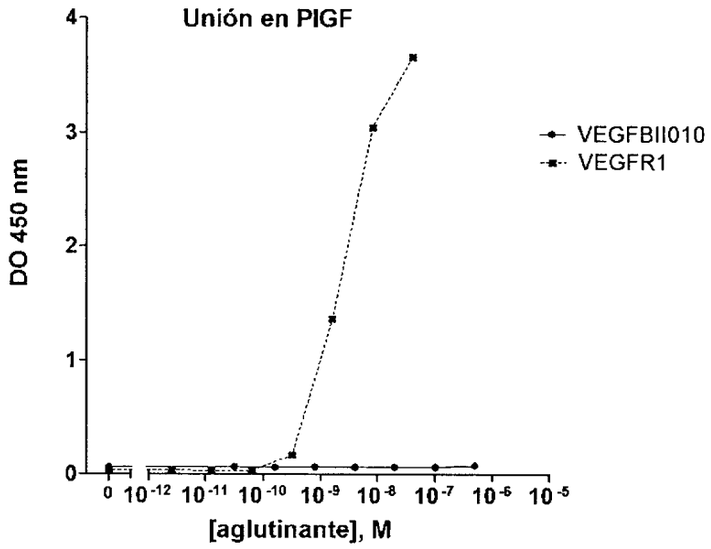

Unión en VEGF D
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
VEGFR3
DO 450 nm
2
1
0
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M

Figura 33-4


Unión en PIGF
DO 450 nm
4
3
2
1
0
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M
VEGFBII010
VEGFR1

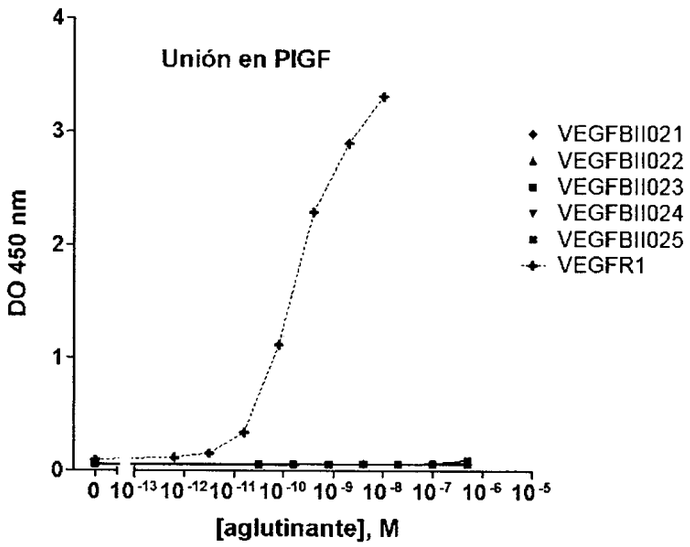
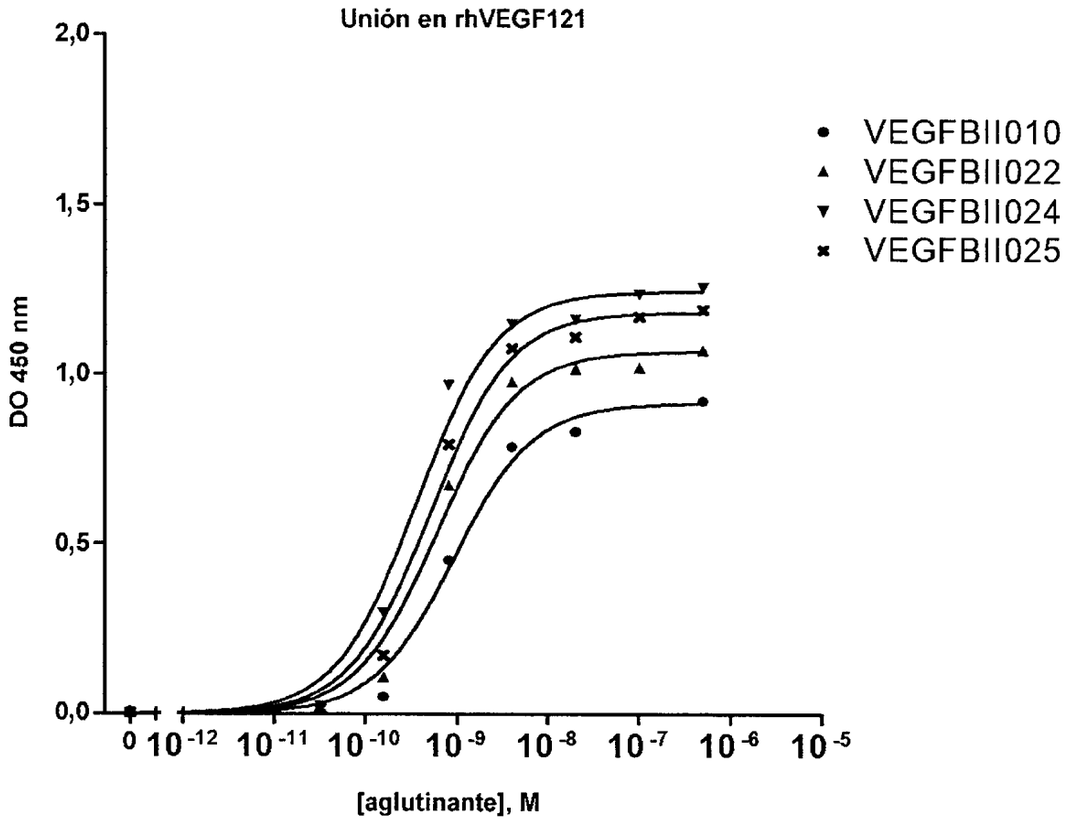

Unión en PIGF
DO 450 nm
4
3
2
1
0
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[aglutinante], M
VEGFBII021
VEGFBII022
VEGFBII023
VEGFBII024
VEGFBII025
VEGFR1

Figura 34



396
395

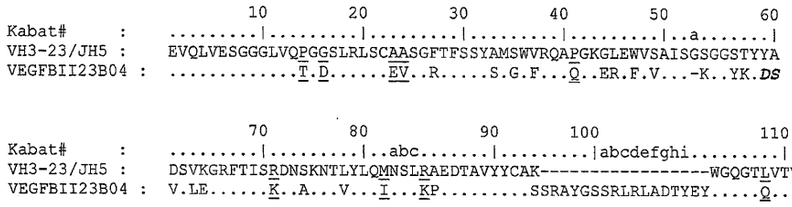

10 20 30 40 50 60
Kabat# : .....|.....|.....|.....|.....|..a.....|
VH3-23/JH5 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
VEGFBII23B04 : .....T.D.....EV..R.....S.G.F...Q..ER.F.V...-K..YK.DS
70 80 90 100 110
Kabat# : .....|.....|..abc.....|.....|abcdefghi.....|...
VH3-23/JH5 : DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------WGQGTLVTVSS
VEGFBII23B04 : V.LE.....K..A...V...I...KP.....SSRAYGSSRLRLADTYEY.....Q.....

Figura 35

Figura 36

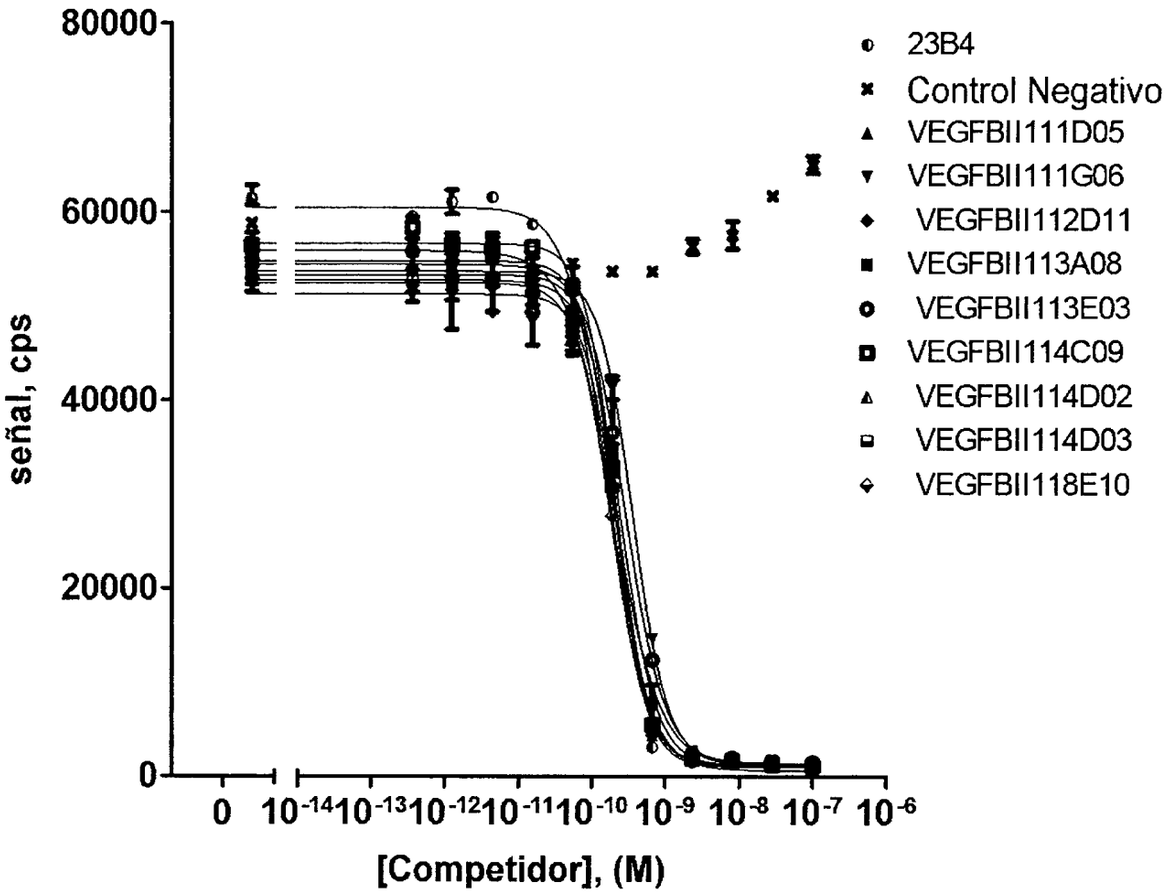
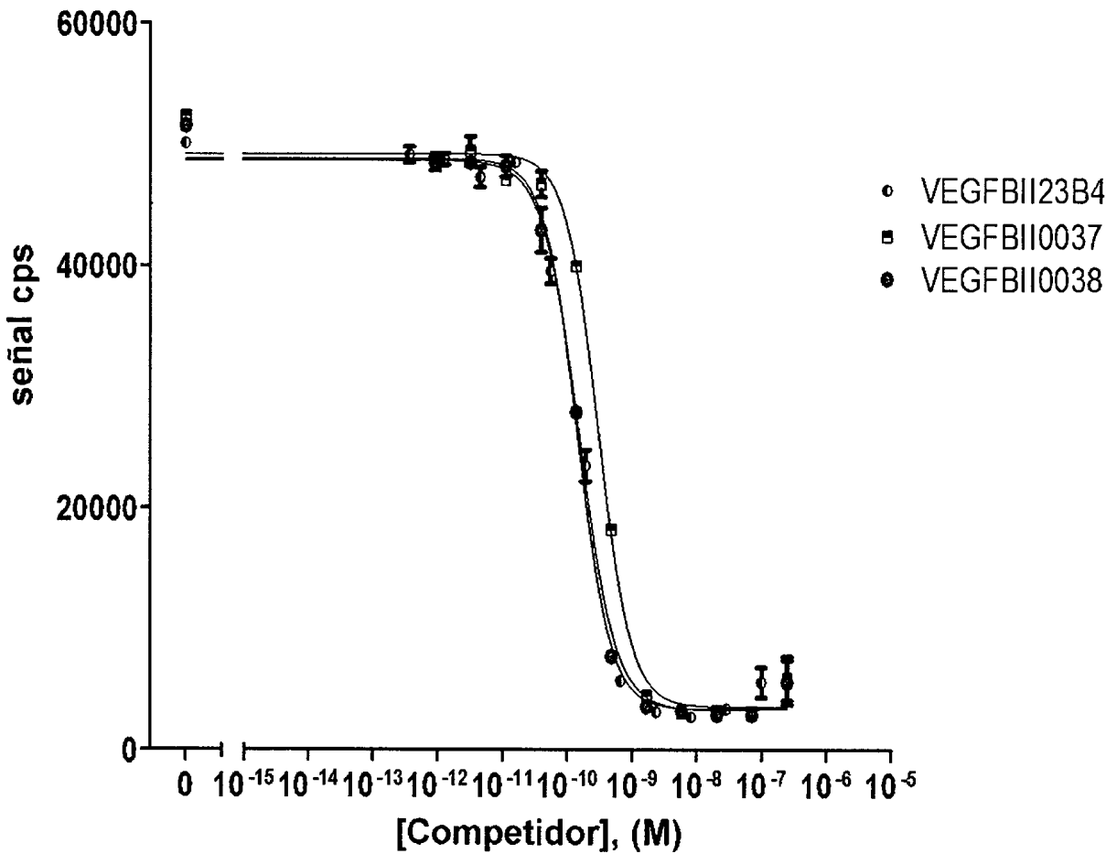

80000
60000
40000
20000
0
señal, cps
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[Competidor], (M)
23B4
Control Negativo
VEGFBII111D05
VEGFBII111G06
VEGFBII112D11
VEGFBII113A08
VEGFBII113E03
VEGFBII114C09
VEGFBII114D02
VEGFBII114D03
VEGFBII118E10

Figura 37


60000
40000
20000
0
señal cps
0 10-15 10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[Competidor], (M)
VEGFBII23B4
VEGFBII0037
VEGFBII0038

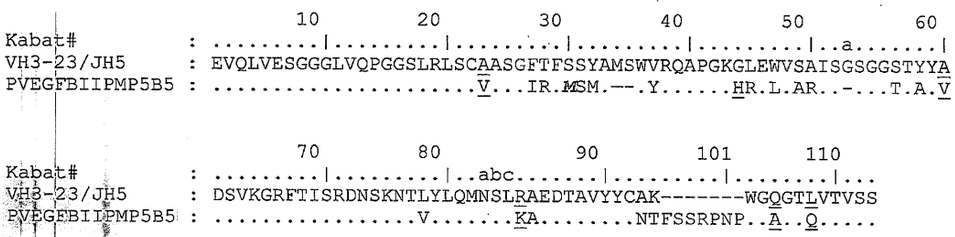
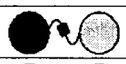
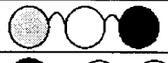
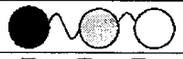

10 20 30 40 50 60
Kabat# : .....|.....|.....|.....|.....|..a.....|
VH3-23/JH5 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
PVEGFBIIPMP5B5 : .....V...IR.MSM.--.Y.....HR.L.AR..-...T.A.V
70 80 90 101 110
Kabat# : .....|.....|..abc.....|.....|.....|...
VH3-23/JH5 : DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-------WGQGTLVTVSS
PVEGFBIIPMP5B5 : .....V.....KA.....NTFSSRPNP..A..Q.....

Figura 38

Figura 39

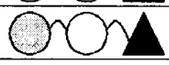
VHH ID	**formato**	**descripción**
VEGFDLLBII001		DLLBII101G08-*35gs,cys15*-VEGFBII23B04
VEGFDLLBII002		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-DLLBII101G08
VEGFDLLBII003		VEGFBII23B04-*35gs*-DLLBII101G08-*9gs*-ALB8
VEGFDLLBII004		VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8-*9gs*-DLLBII101G08
VEGFDLLBII005		DLLBII101G08-*35gs*-VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8
VEGFDLLBII006		DLLBII101G08-*9gs*-ALB8-*9gs*-VEGFBII23B04

Leyenda:

Nanocuerpo o enlazador	**descripción**
	DLLBII101G08
	VEGFBII23B04
	ALB8
	enlazador *9gs*
	enlazador *35gs*
	enlazador PEGilado *35gs,cys15*

40

Figura 40

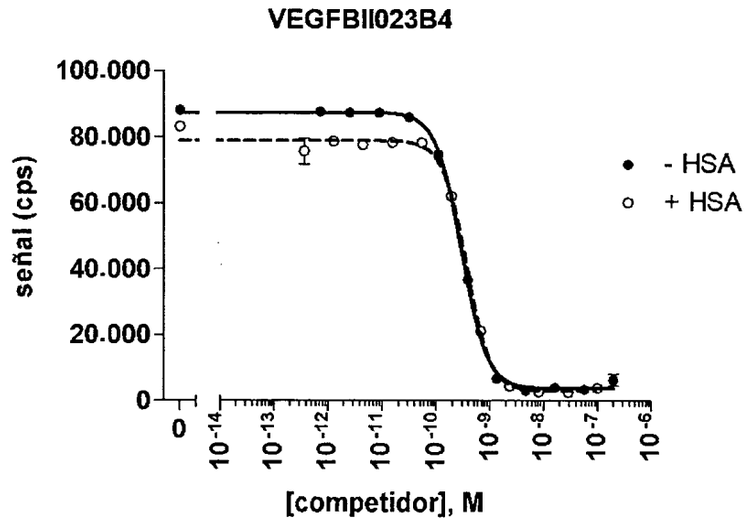
VHH ID	Formato	descripción
VEGFDLLBII010		VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8-*9gs*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII011		VEGFBII23B04-*9gs*-ALB8-9gs-DLLBII136C07
VEGFDLLBII012		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-DLLBII136C07
VEGFDLLBII013		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII014		VEGFBII23B04-*9gs*-5B5-*35gs,cys15*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII015		VEGFBII23B04-*35gs,cys15*-5B05-*35gs*-DLLBII129B05
VEGFDLLBII016		VEGFBII23B04-*35gs*-DLLBII129B05-*9gs*-ALB8

Leyenda:

Nanocuerpo o enlazador	descripción
■	DLLBII129B05
▲	DLLBII136C07
◯	VEGFBII23B04
▭	5B05
○	ALB8
⌒	enlazador *9gs*
∿	enlazador *35gs*
∿	enlazador PEGilado *35gs,cys15*

402
401

Figura 41-1


VEGFBII023B4
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

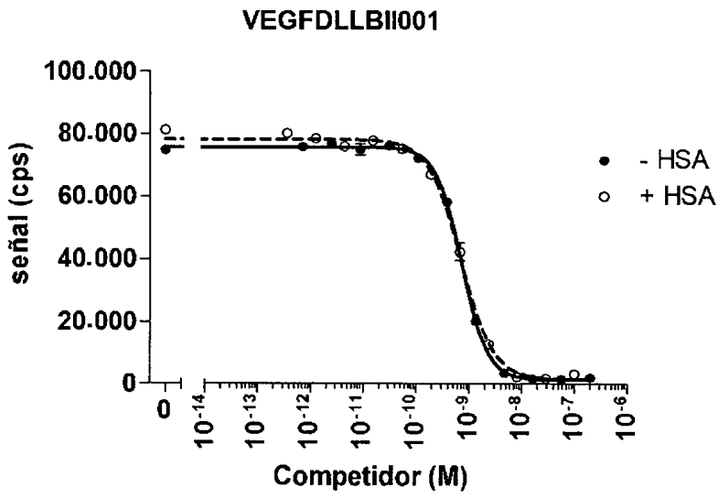
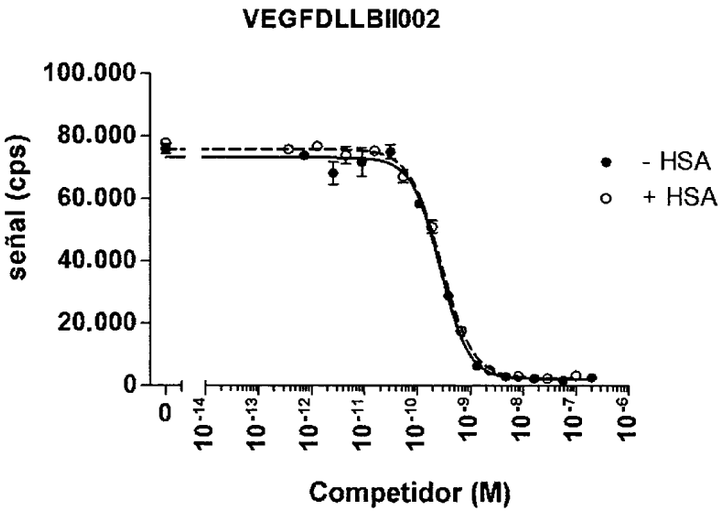

VEGFDLLBII001
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competidor (M)

Figura 41-2


VEGFDLLBII002
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competidor (M)

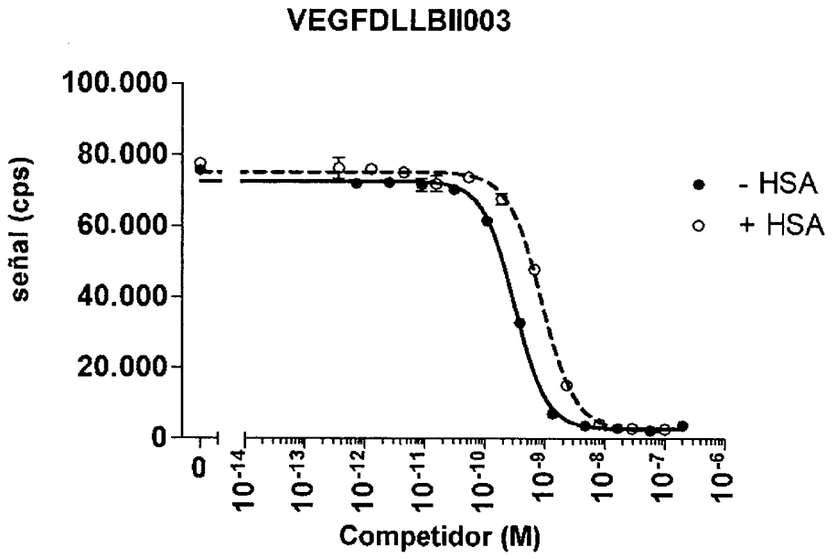
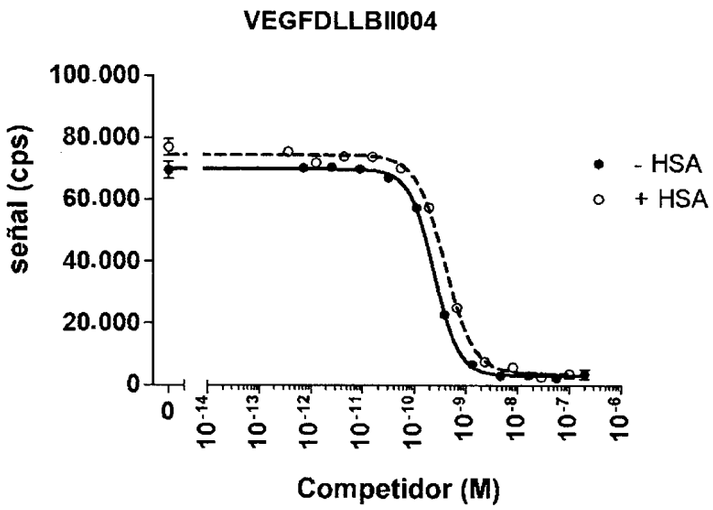

VEGFDLLBII003
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competidor (M)

Figura 41-3


VEGFDLLBII004
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competidor (M)

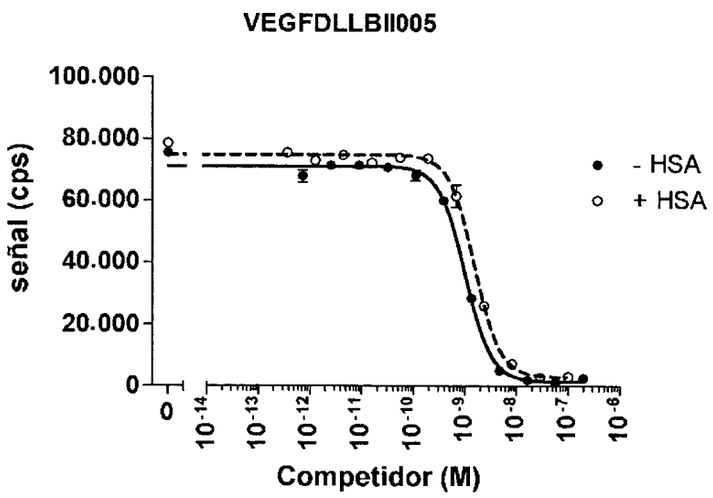

VEGFDLLBII005
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competidor (M)

Figura 41-4

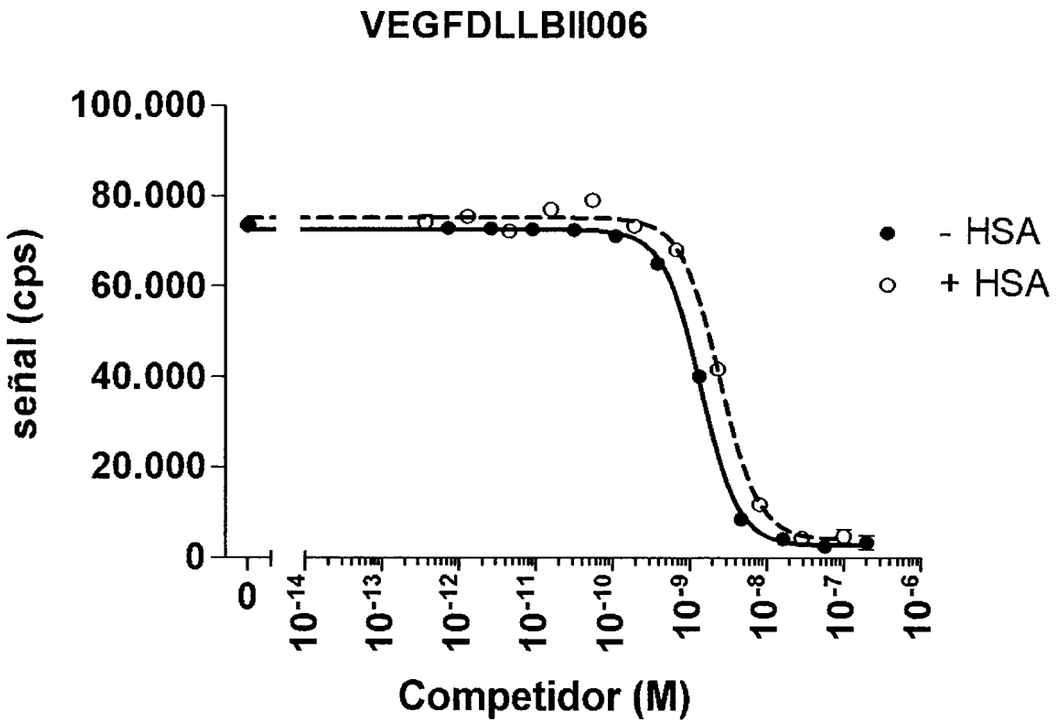
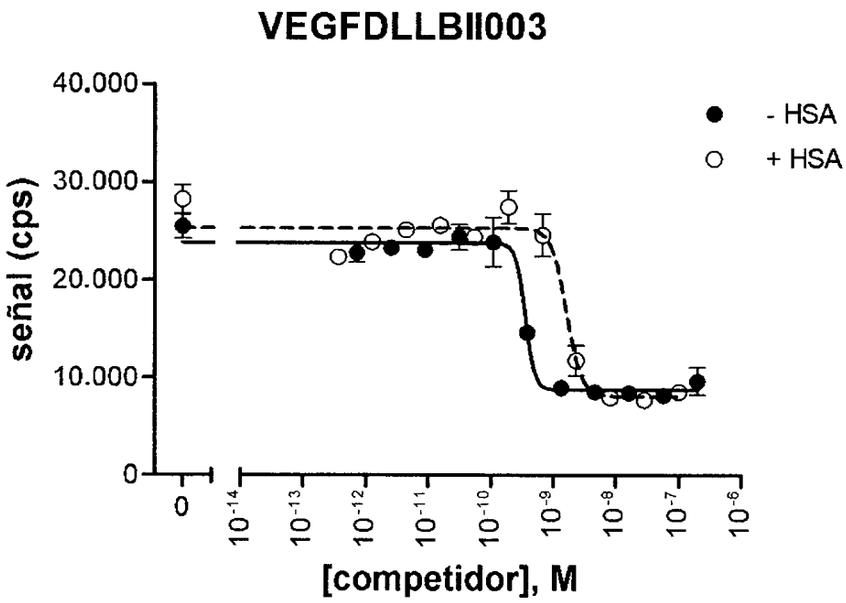

VEGFDLLBII006
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Competidor (M)
- HSA
+ HSA

Figura 42-1


VEGFDLLBII003
40.000
30.000
20.000
10.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

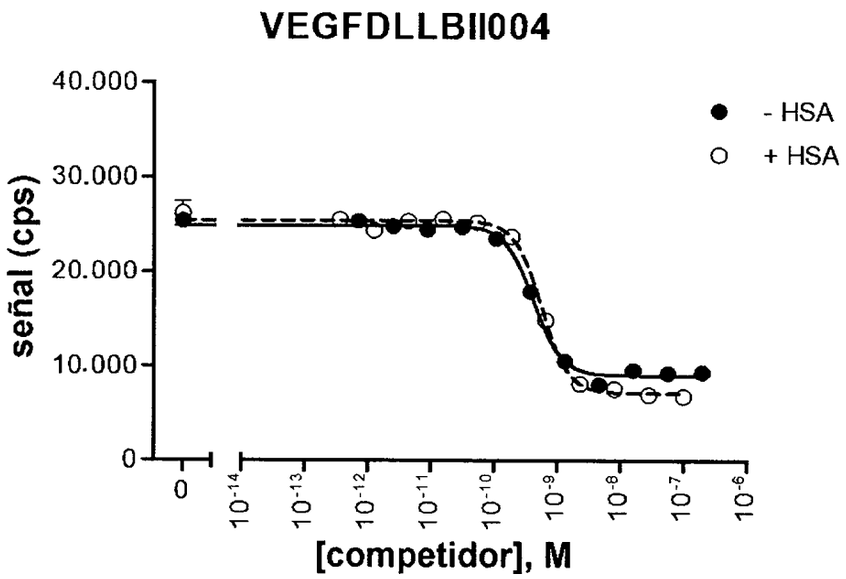
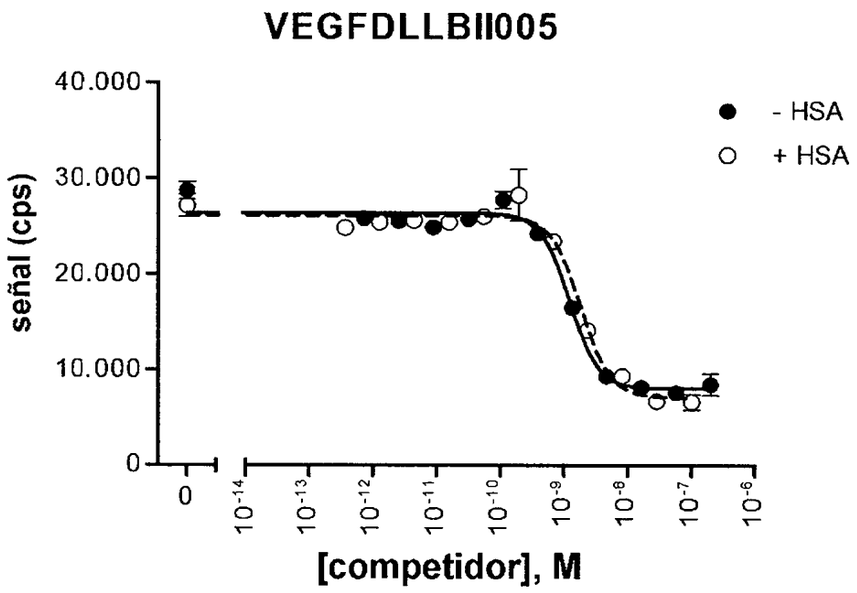
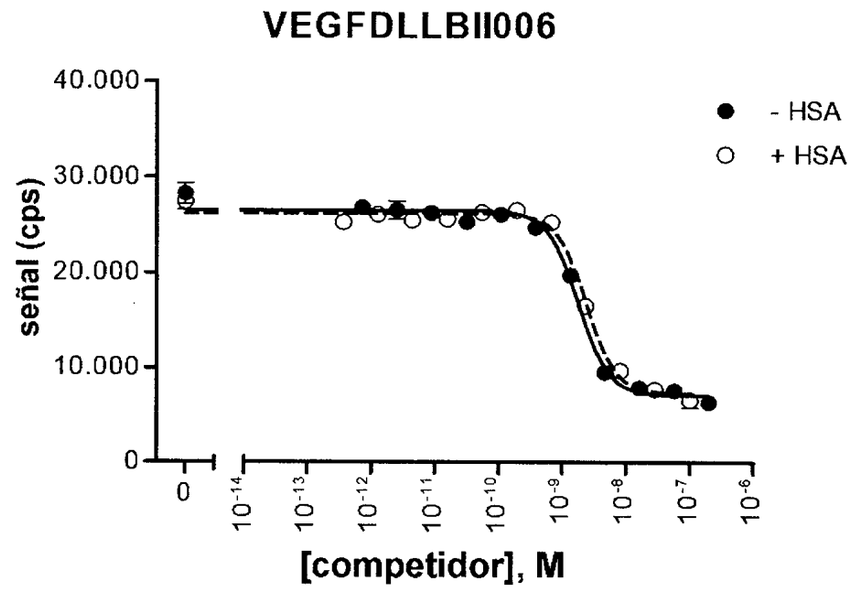

VEGFDLLBII004
40.000
30.000
20.000
10.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

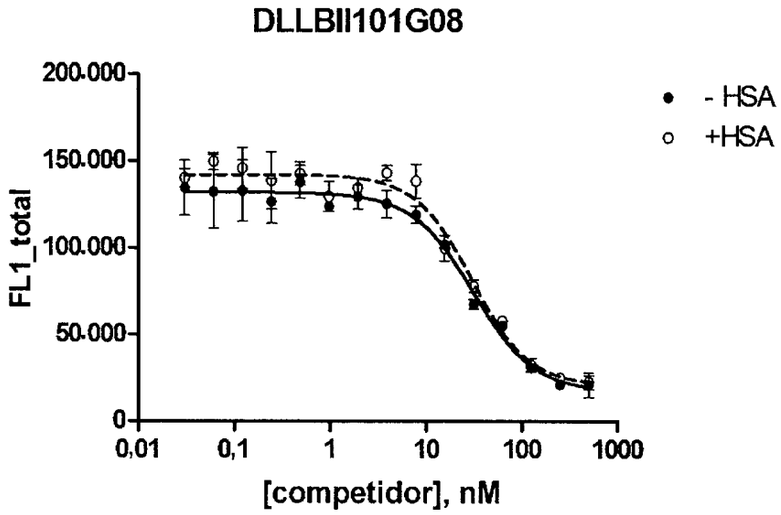
Figura 42-2





408.
407

Figura 43-1


DLLBII101G08
200.000
150.000
100.000
50.000
0
FL1_total
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
- HSA
+HSA

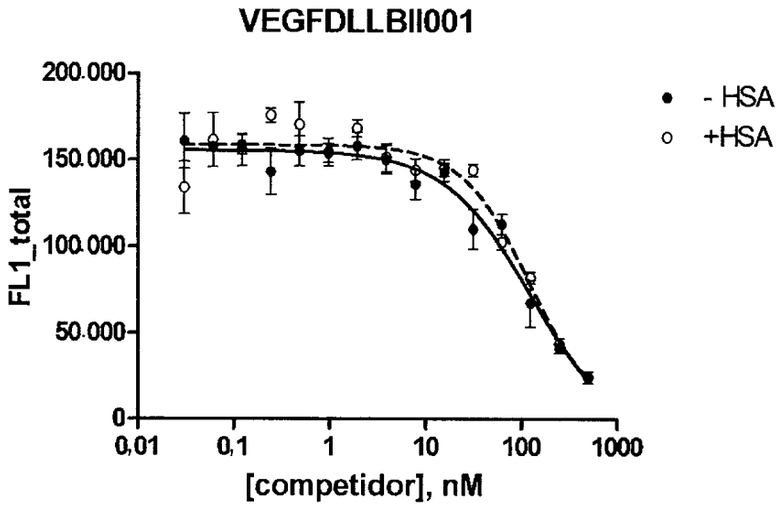
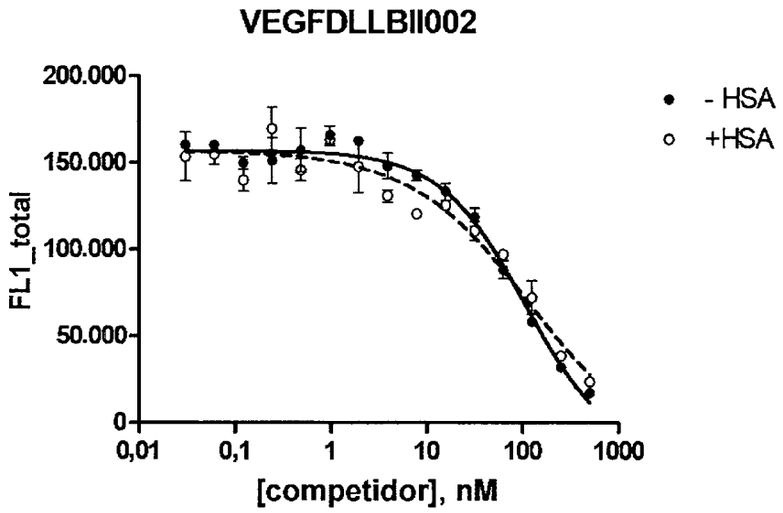

VEGFDLLBII001
200.000
150.000
100.000
50.000
0
FL1_total
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
- HSA
+HSA

Figura 43-2


VEGFDLLBII002
200.000
150.000
100.000
50.000
0
FL1_total
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
- HSA
+HSA

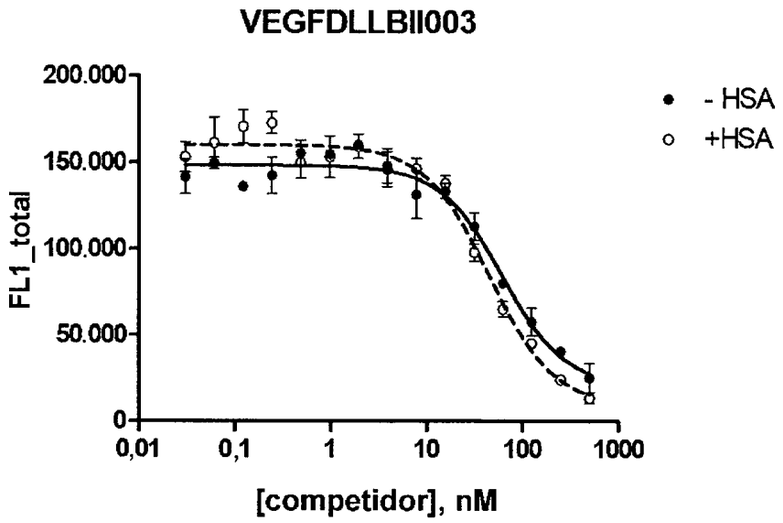
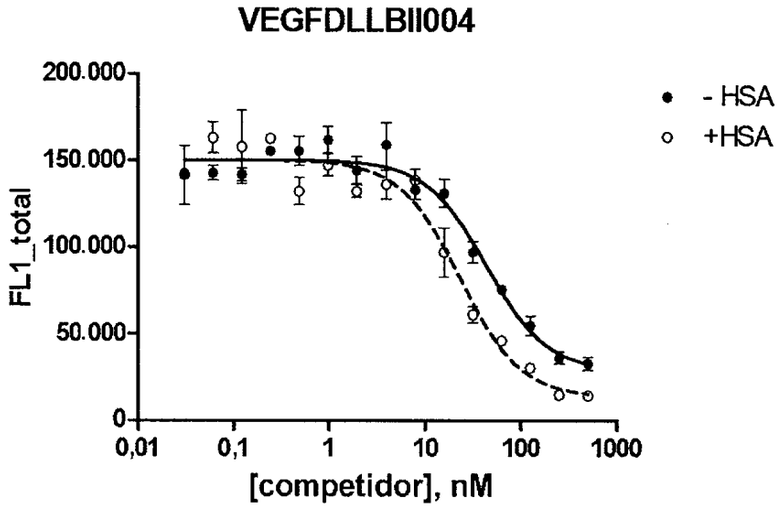

VEGFDLLBII003
200.000
150.000
100.000
50.000
0
FL1_total
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
- HSA
+HSA

Figura 43-3


VEGFDLLBII004
200.000
150.000
100.000
50.000
0
FL1_total
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
- HSA
+HSA

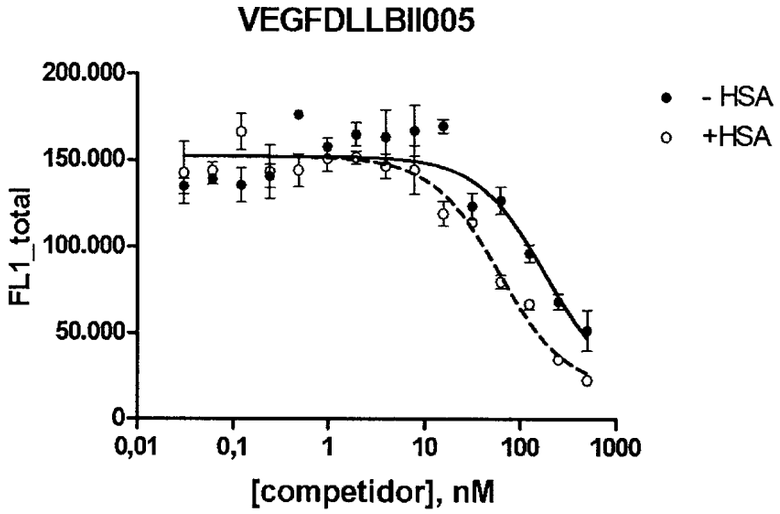
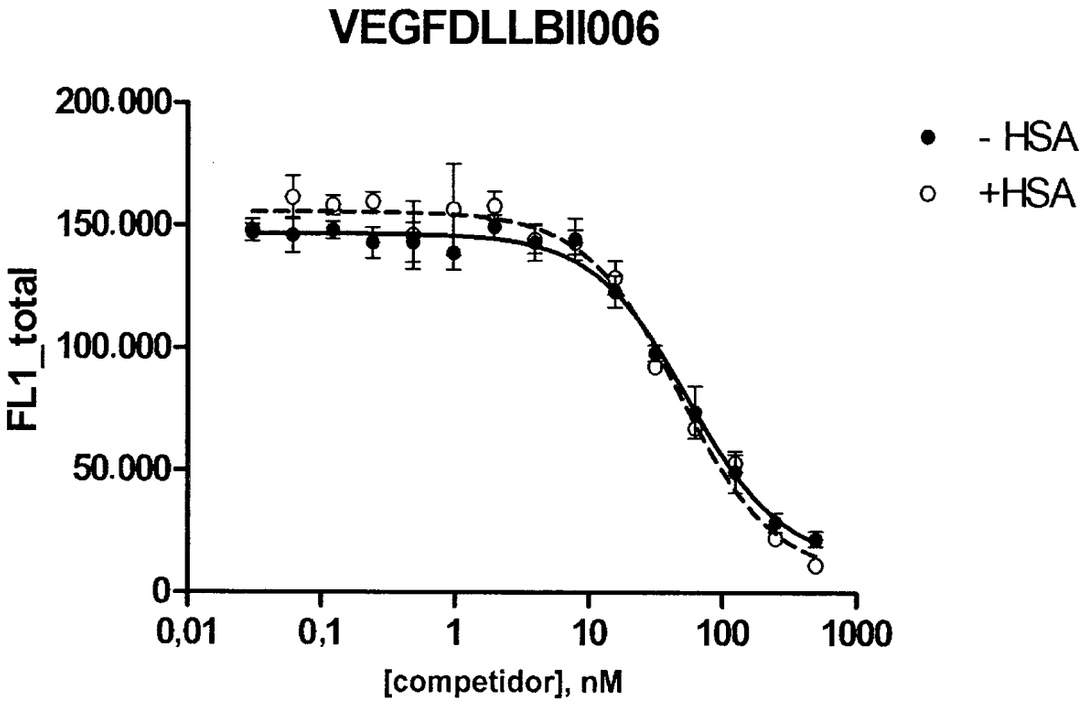
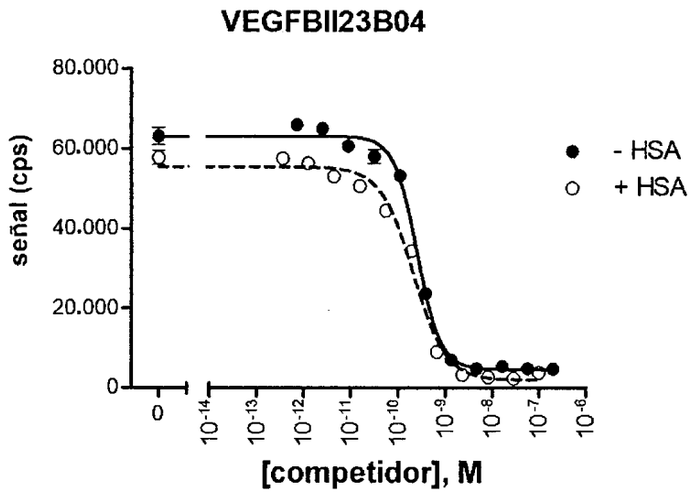

VEGFDLLBII005
200.000
150.000
100.000
50.000
0
FL1_total
0,01
0,1
1
10
100
1000
[competidor], nM
- HSA
+HSA

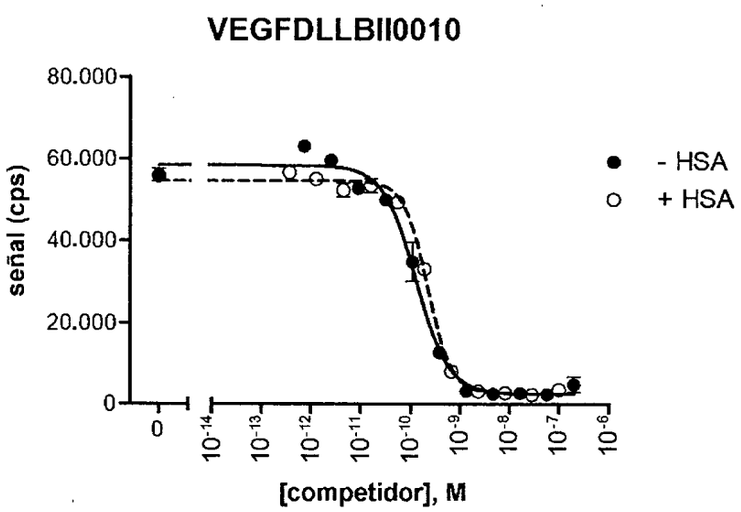
Figura 43-4



412
911

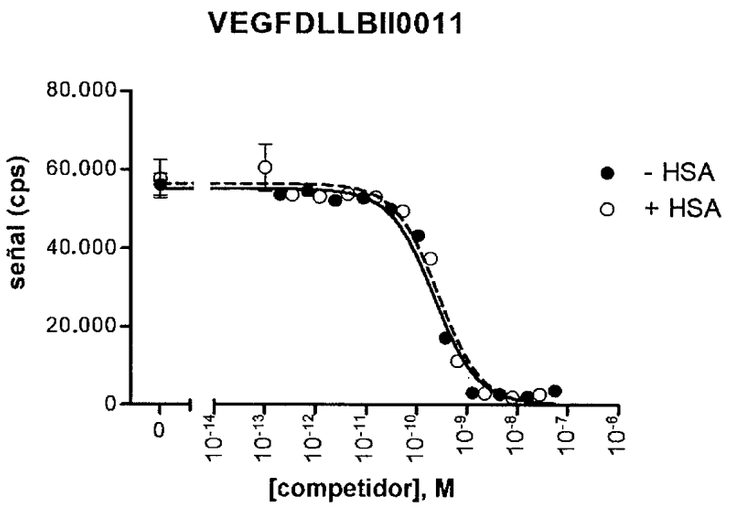
Figura 44-1





413
972

Figura 44-2


VEGFDLLBII0011
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

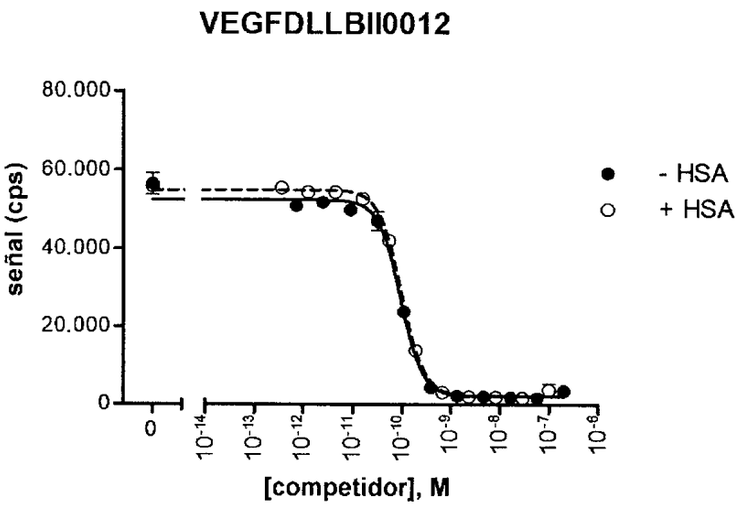
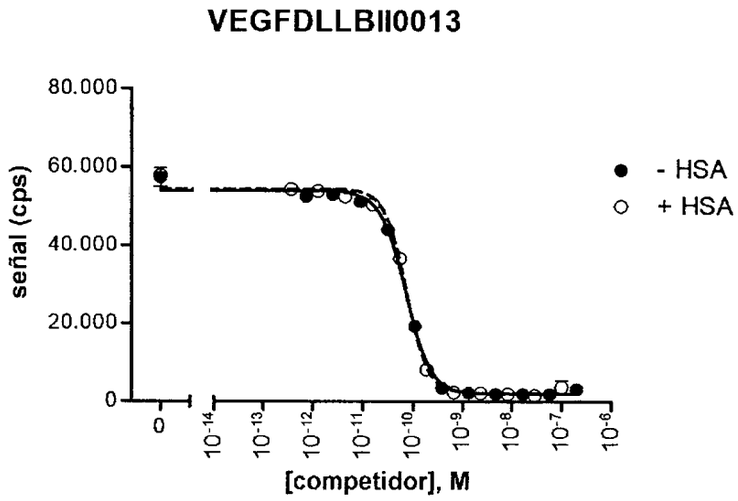
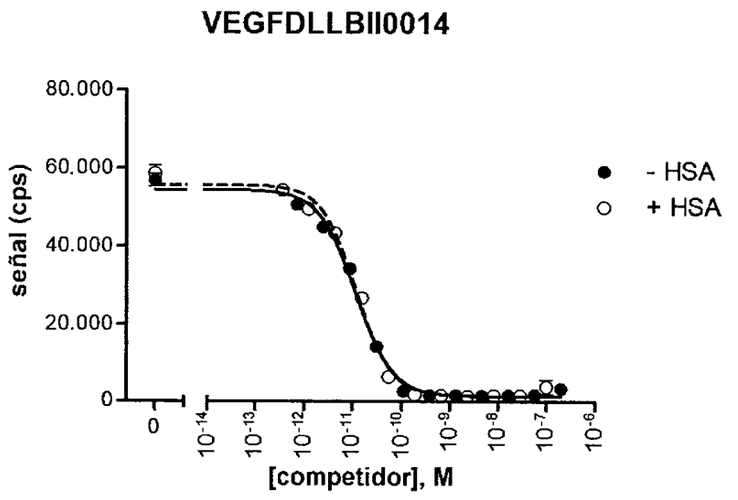

VEGFDLLBII0012
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

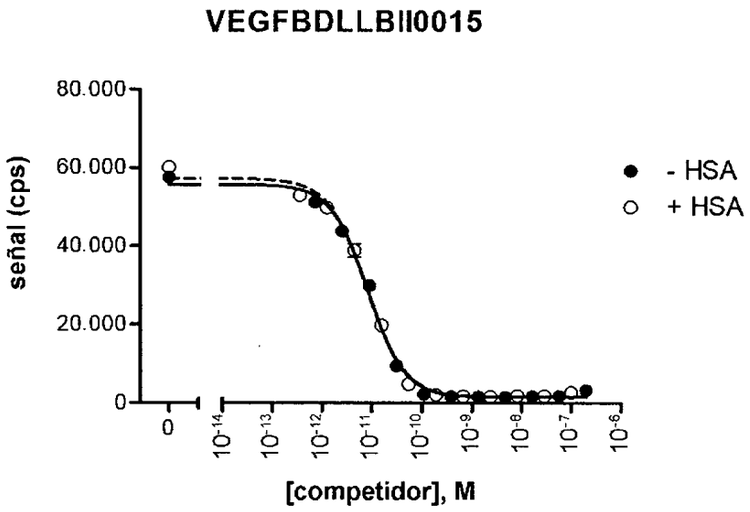
Figura 44-3





415
419

Figura 44-4


VEGFBDLLBII0015
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

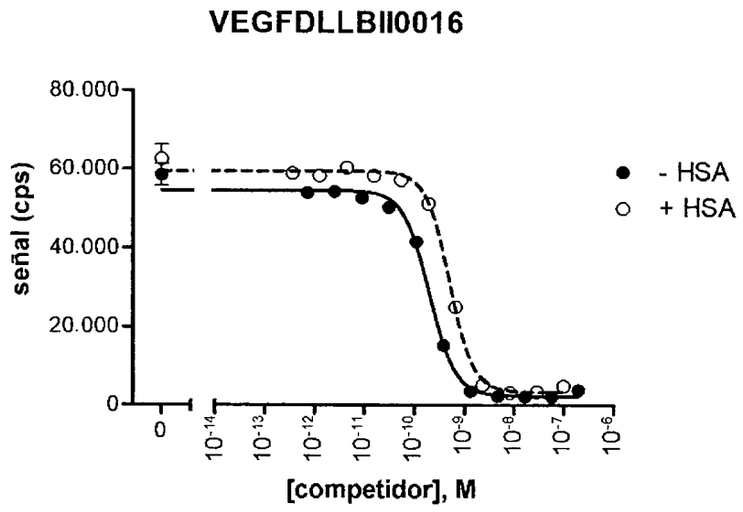
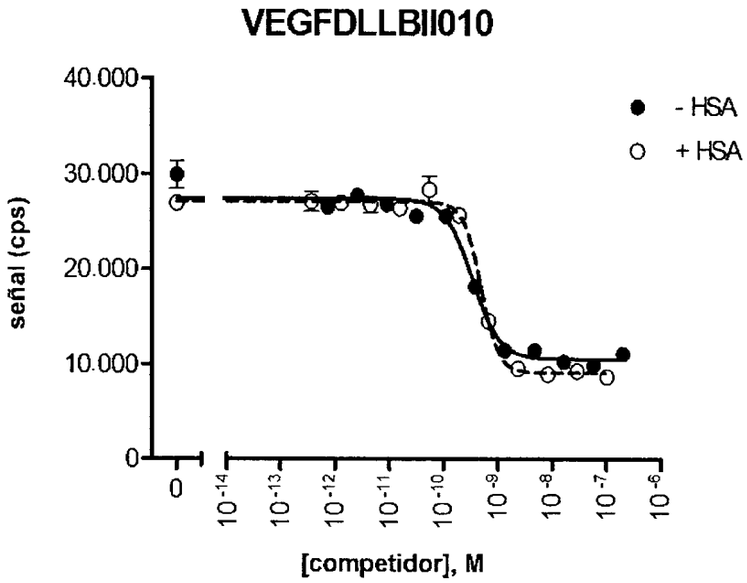

VEGFDLLBII0016
80.000
60.000
40.000
20.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

Figura 45-1


VEGFDLLBII010
40.000
30.000
20.000
10.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

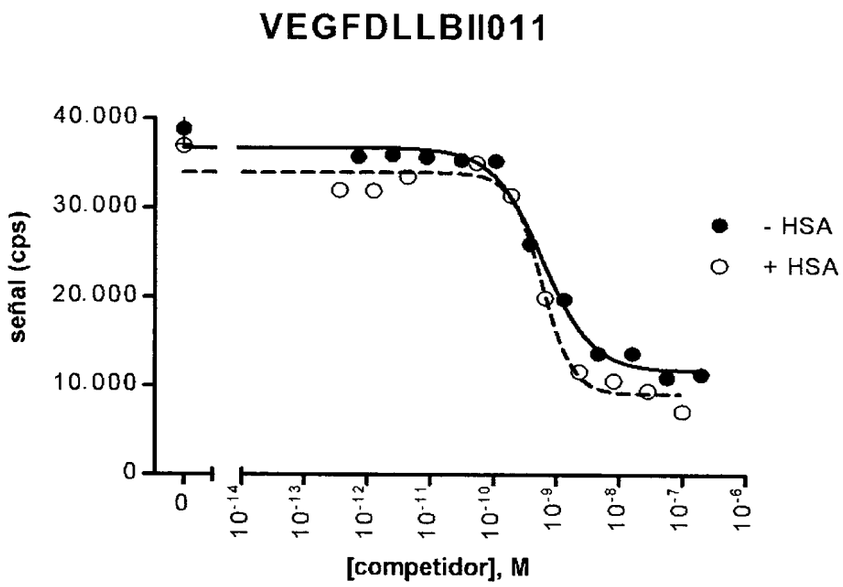

VEGFDLLBII011
40.000
30.000
20.000
10.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

Figura 45-2

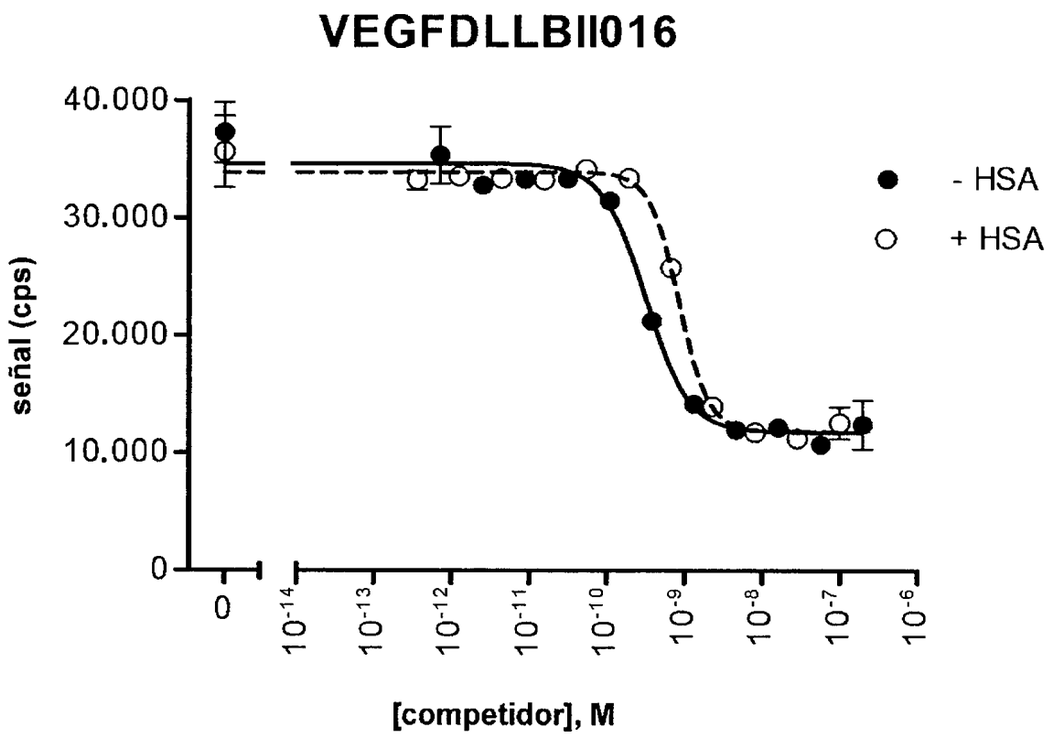
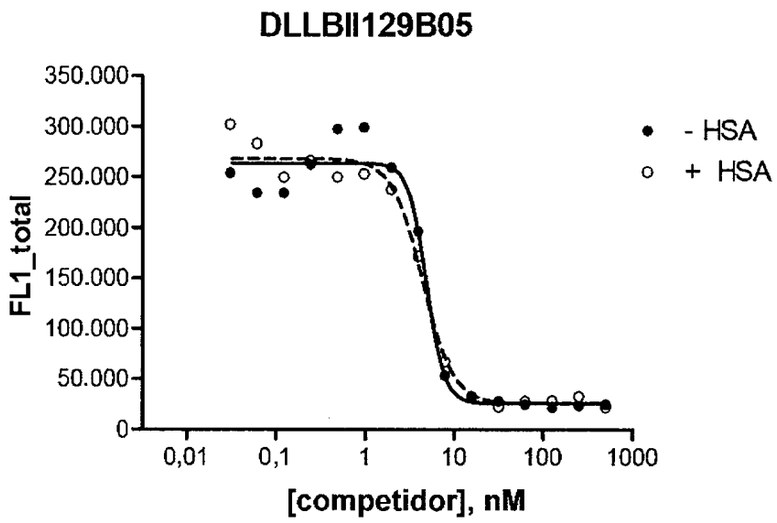

VEGFDLLBII016
40.000
30.000
20.000
10.000
0
señal (cps)
- HSA
+ HSA
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[competidor], M

Figura 46-1

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

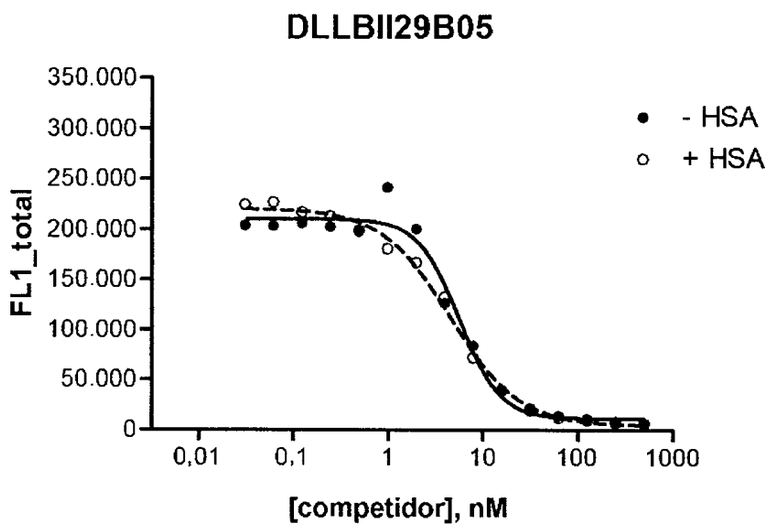
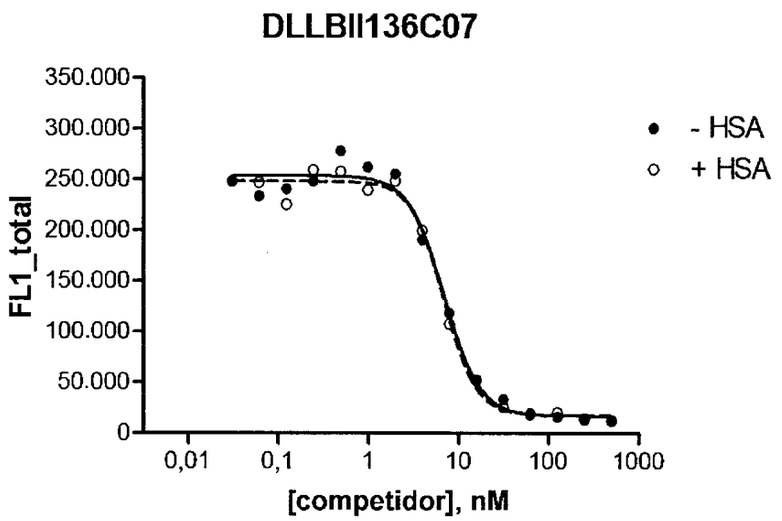


Figura 46-2

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

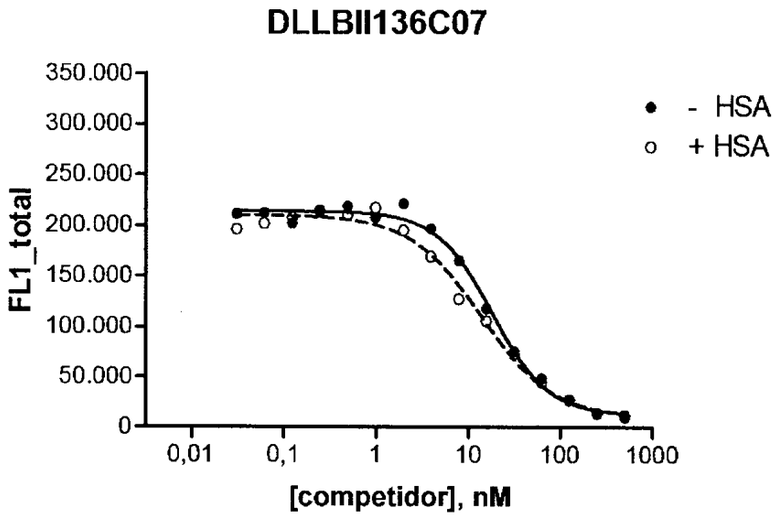
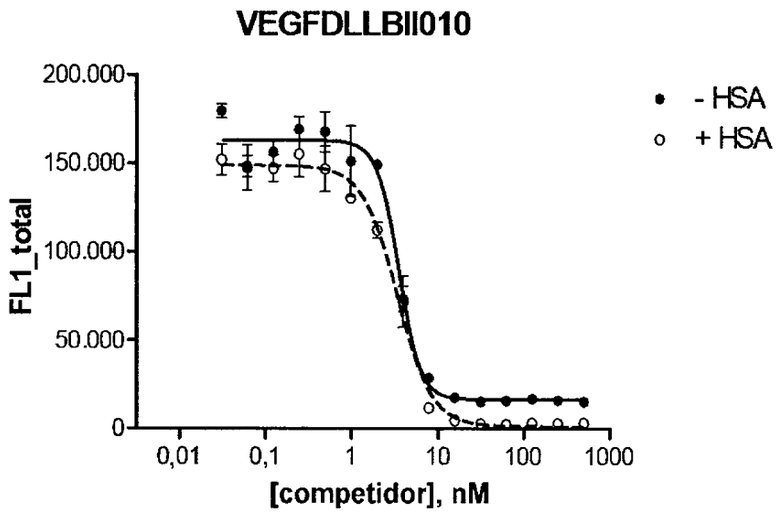


Figura 46-3

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

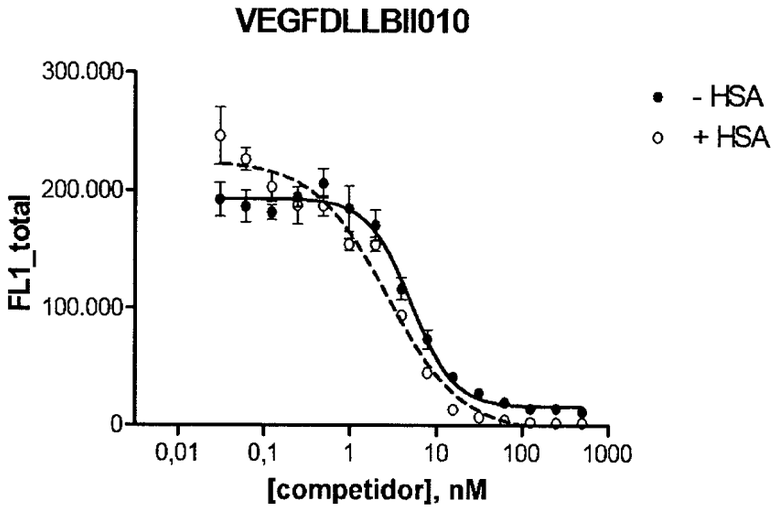
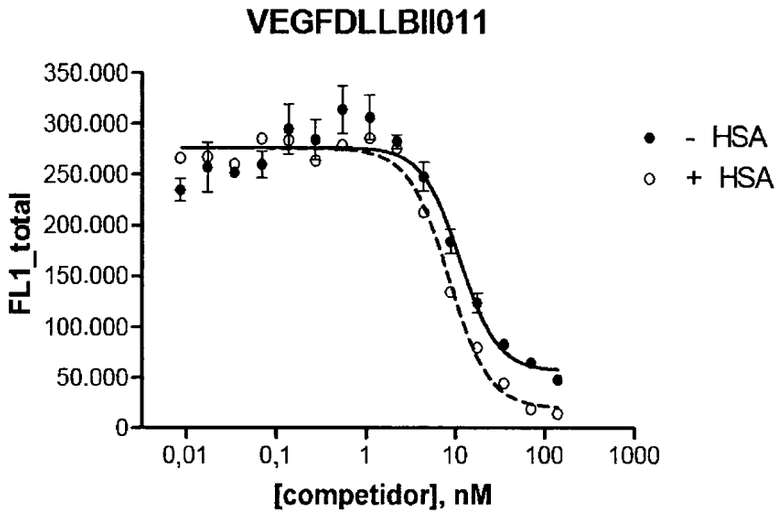


Figura 46-4

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

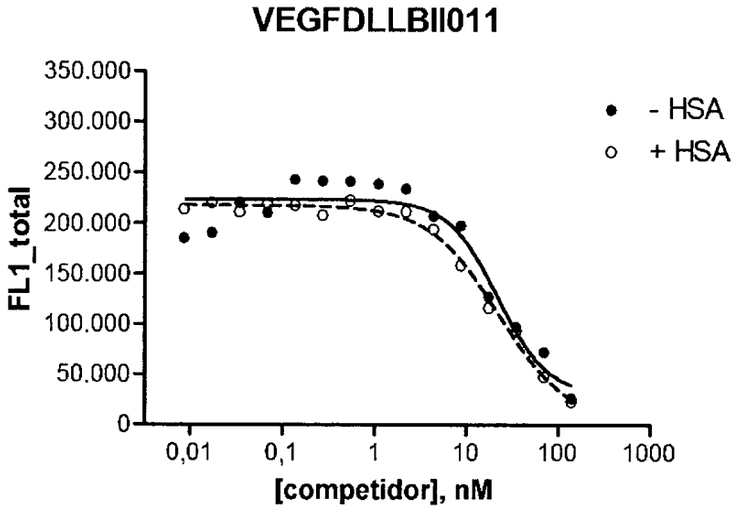
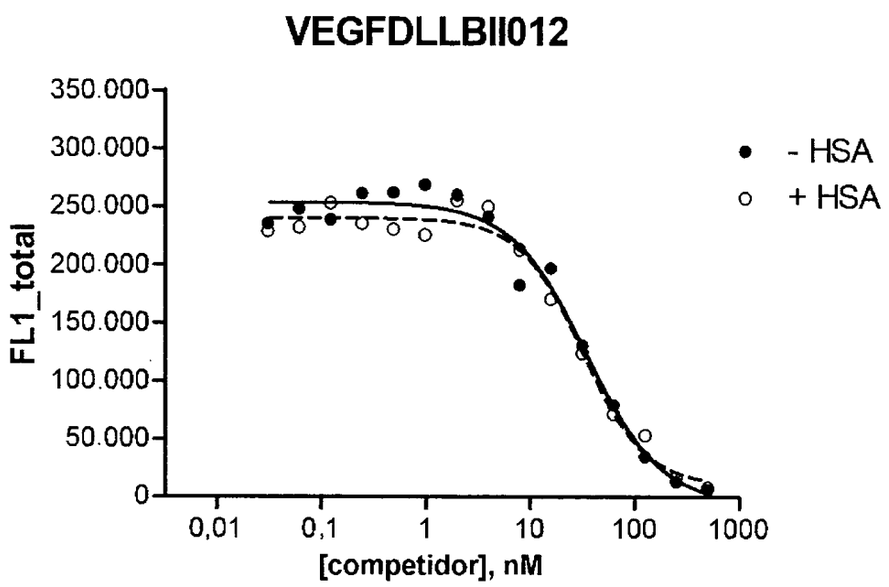


Figura 46-5

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

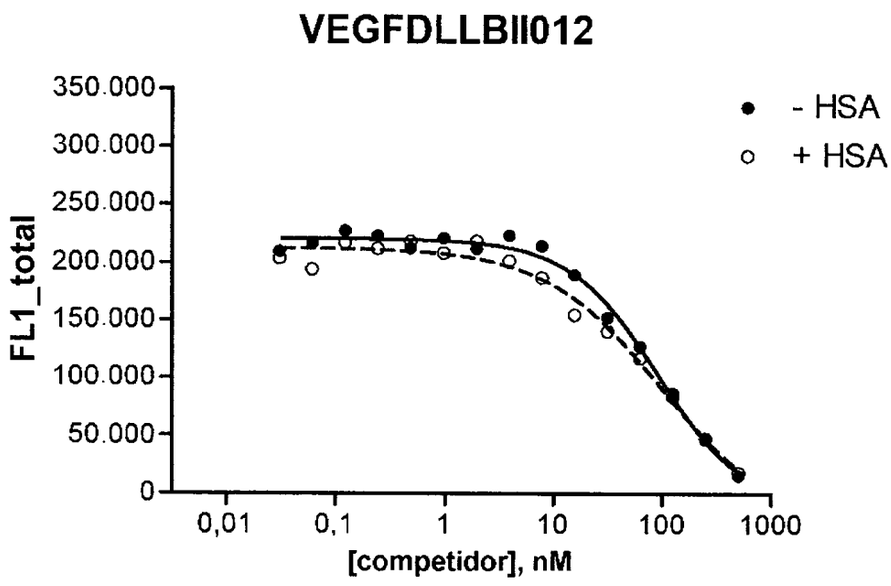
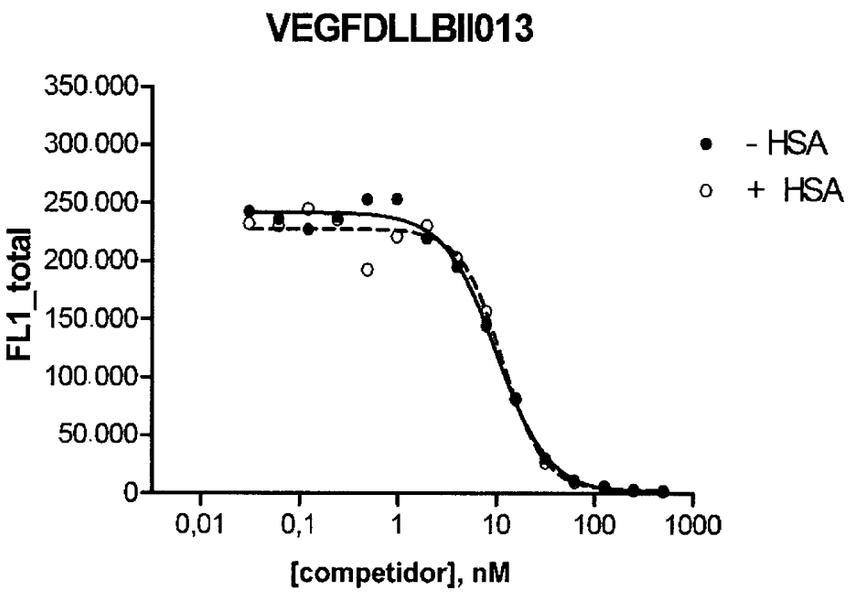


Figura 46-6

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

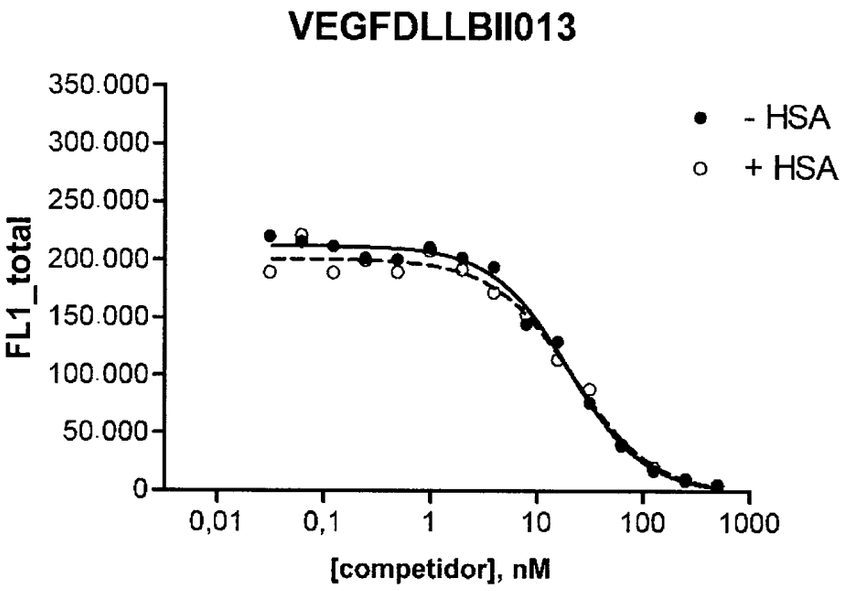
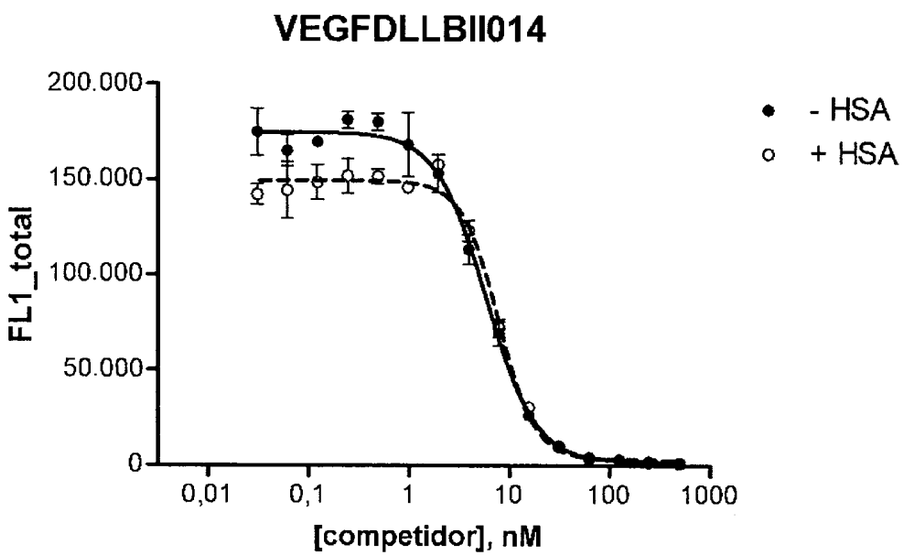
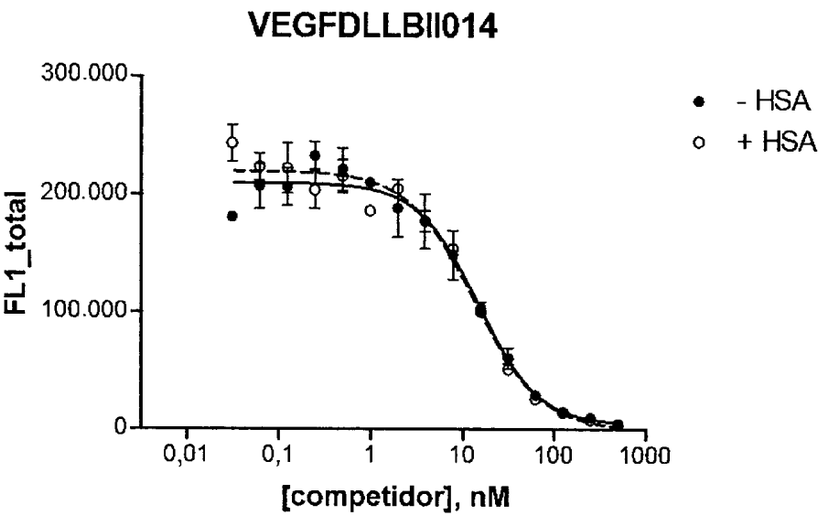


Figura 46-7

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



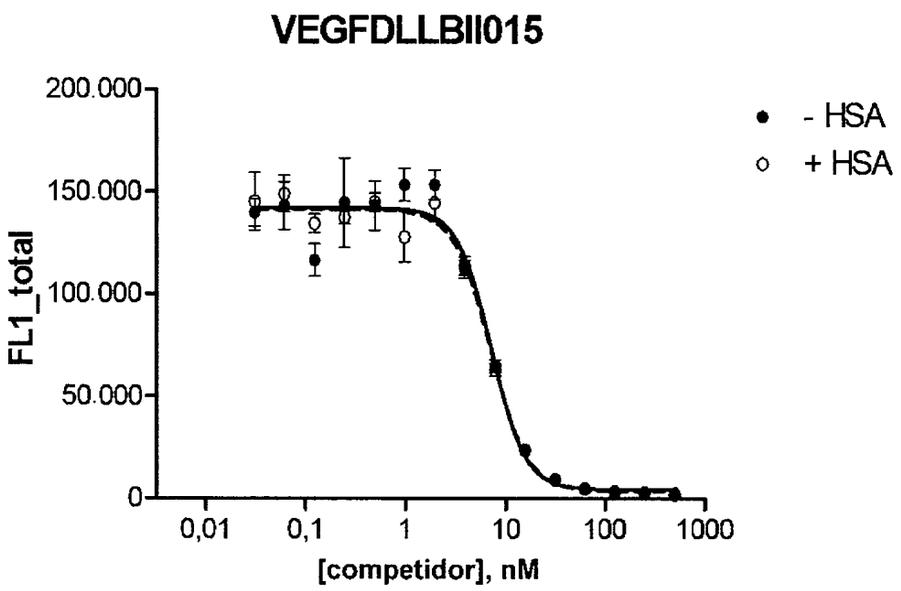
FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1



425
~~429~~

Figura 46-8

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

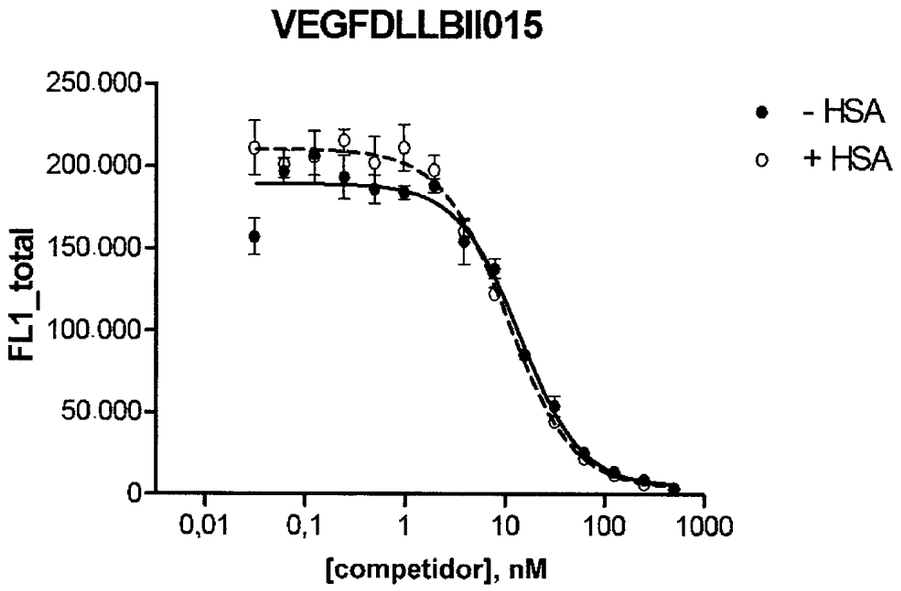
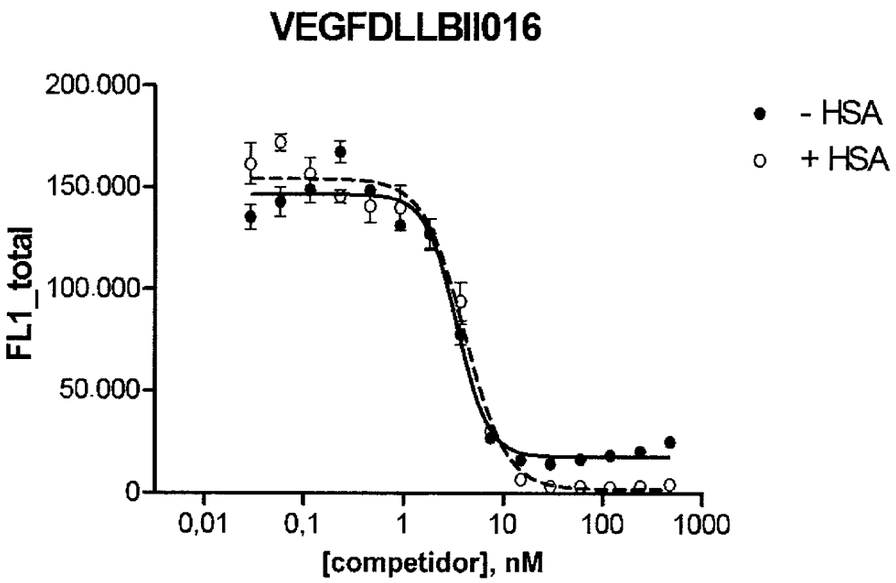


Figura 46-9

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

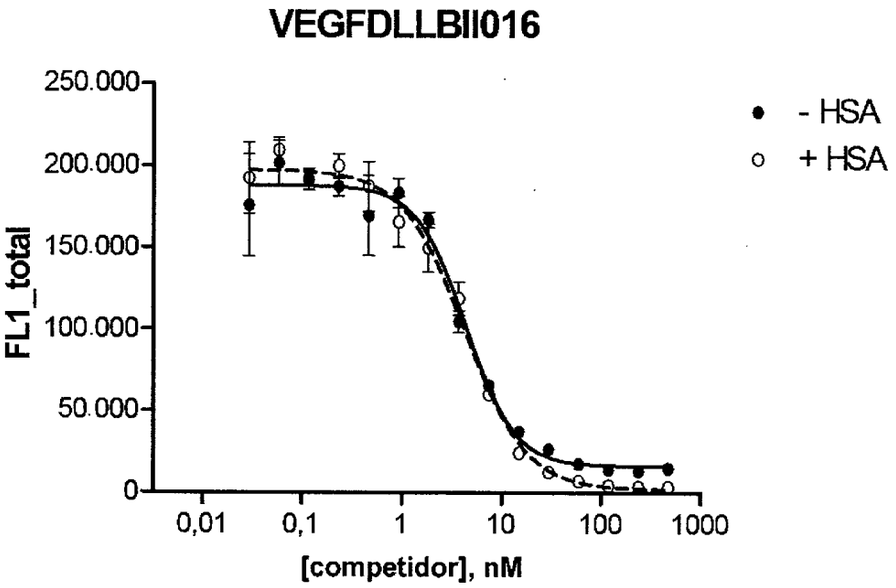
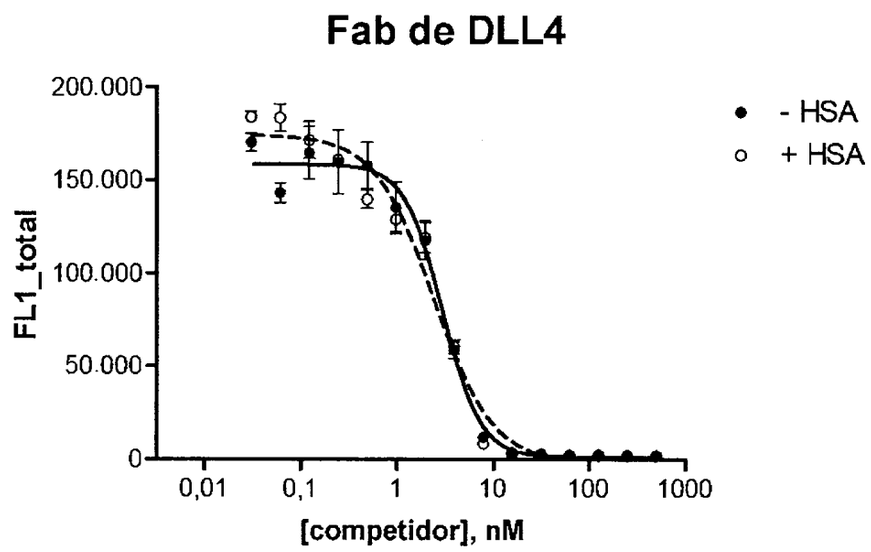


Figura 46-10

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

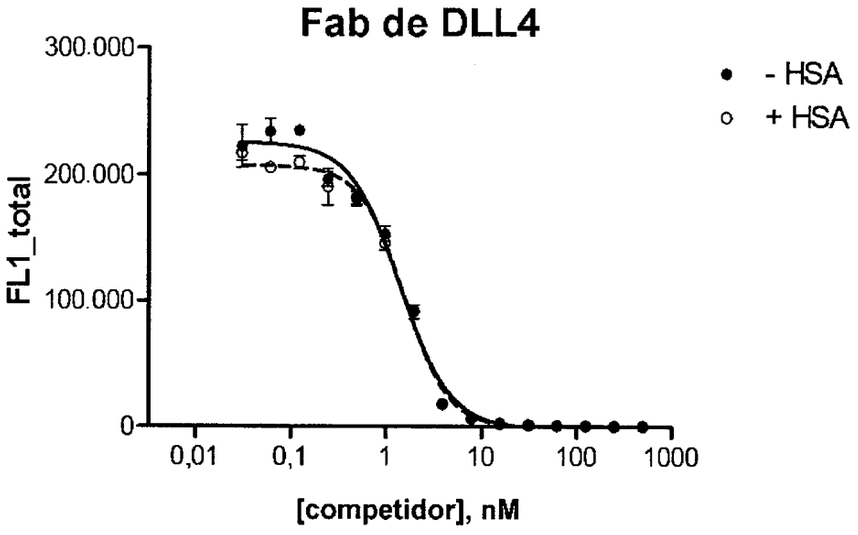
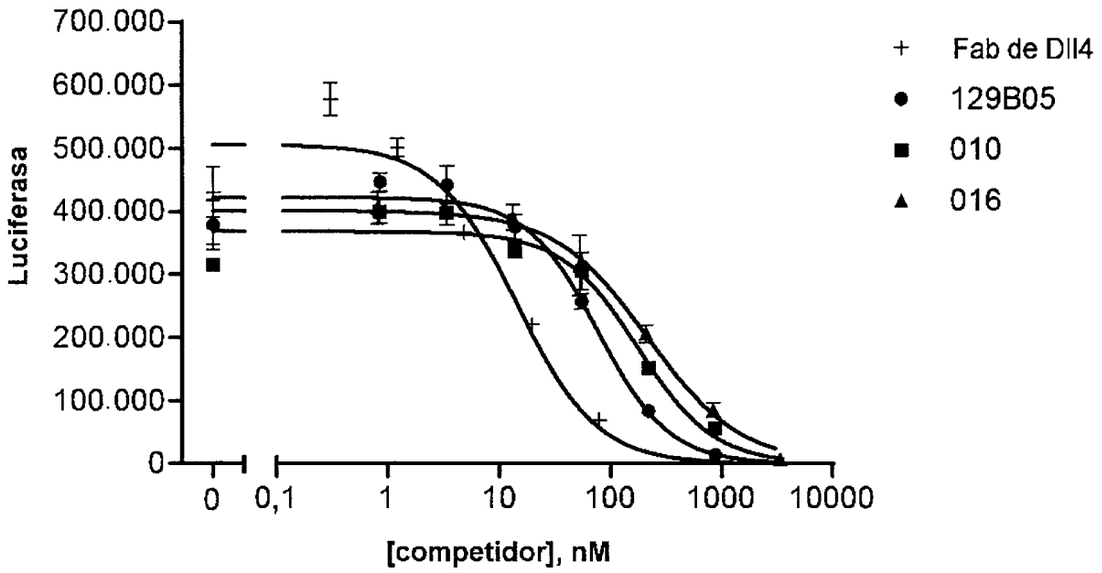
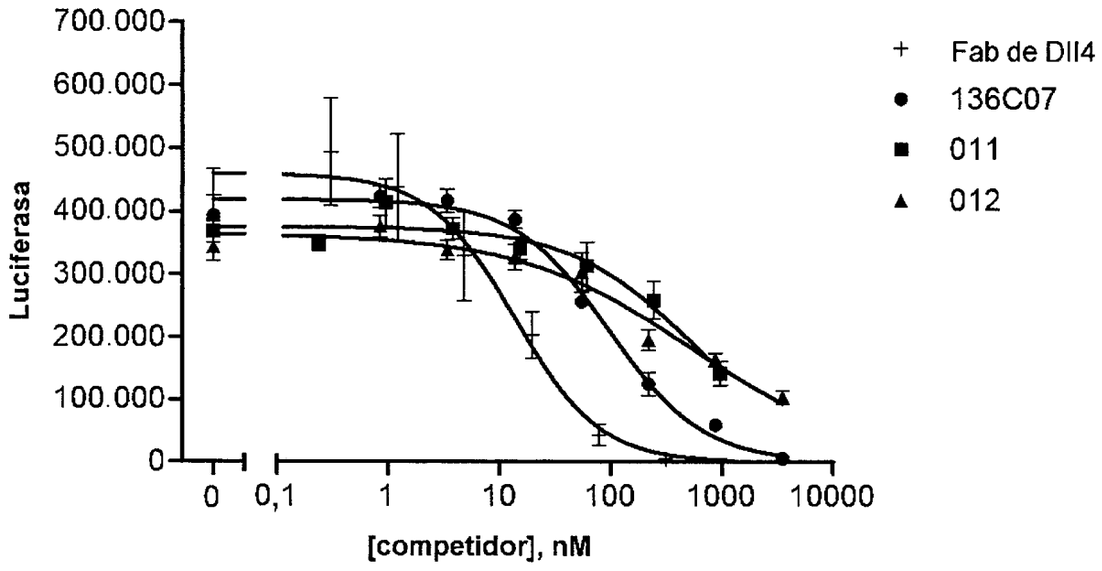


Figura 47-1





429
4-28

Figura 47-2

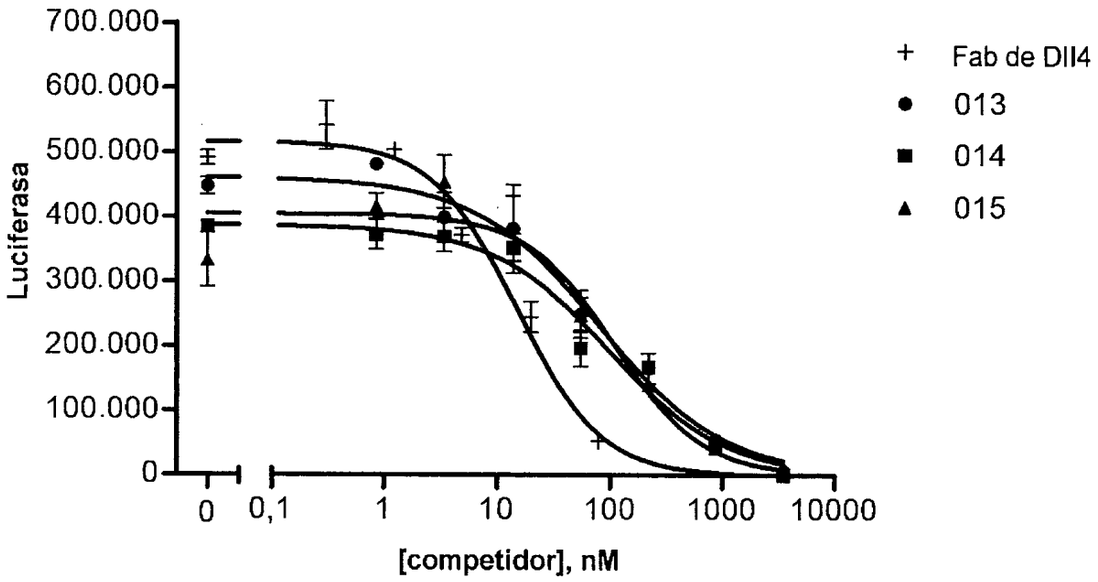
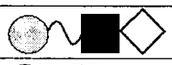
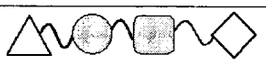

700.000
600.000
500.000
400.000
300.000
200.000
100.000
0
Luciferasa
0
0,1
1
10
100
1000
10000
[competidor], nM
+ Fab de Dll4
● 013
■ 014
▲ 015

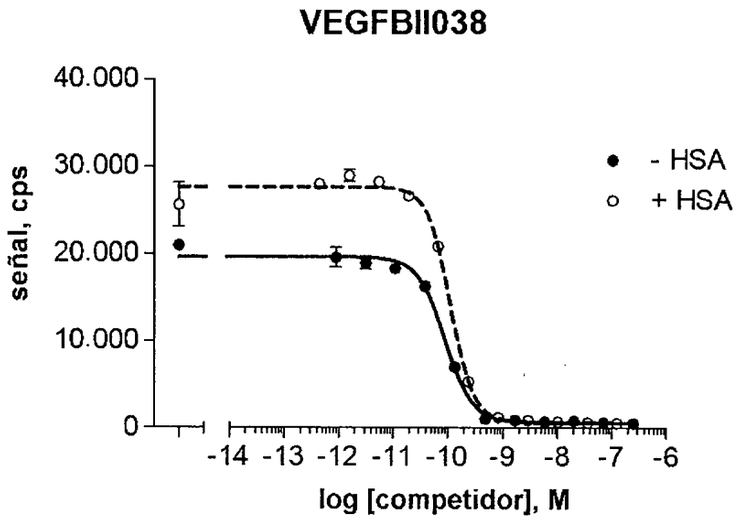
Figura 48

VHH ID	Formato	descripción
A1		VEGFBII038-*35gs,cys15*-DLLBII018
A2		VEGFBII038-*9gs*-ALB8-*9gs*-DLLBII018
A3		VEGFBII038-*35gs,cys15*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018
HSA1		VEGFBII038-*35gs*-DLLBII018-HSA
HSA2		VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018-HSA
HSA3		DLLBII039-*35gs*-VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-HSA
HSA4		VEGFBII038-*35gs*-DLLBII018-*35gs*-HSA
HSA5		VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-DLLBII018-*35gs*-HSA
HSA6		DLLBII039-*35gs*-VEGFBII038-*9gs*-VEGFBII032-*35gs*-HSA

Leyenda:

Nanocuerpo, enlazador o HSA	**decripción**
	DLLBII018
	DLLBII039
	VEGFBII038
	VEGFBII032
	HSA
	ALB8
	enlazador *9gs*
	enlazador *35gs*
	PEGylated *35gs,cys15* linker

Figura 49-1


VEGFBII038
40.000
30.000
20.000
10.000
0
señal, cps
- HSA
+ HSA
-14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competidor], M

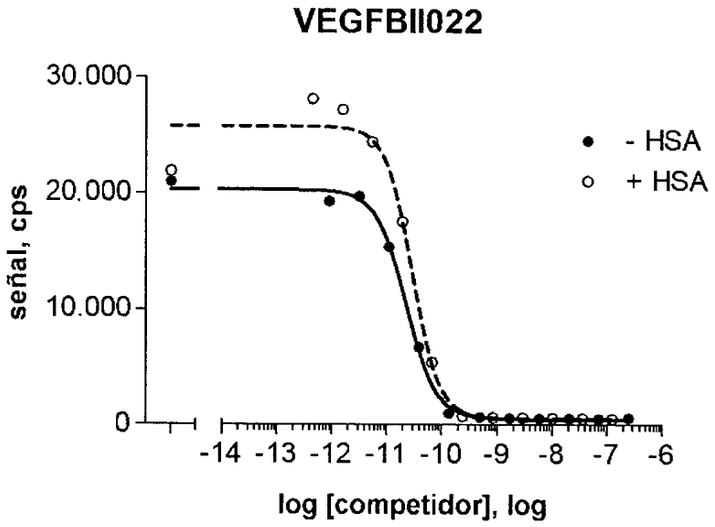
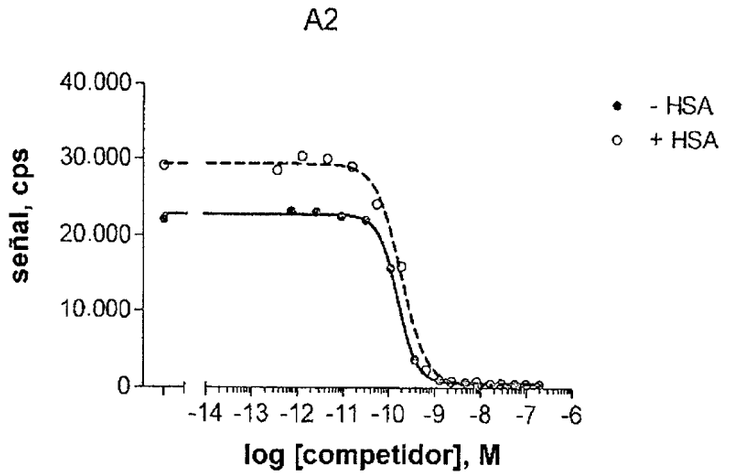
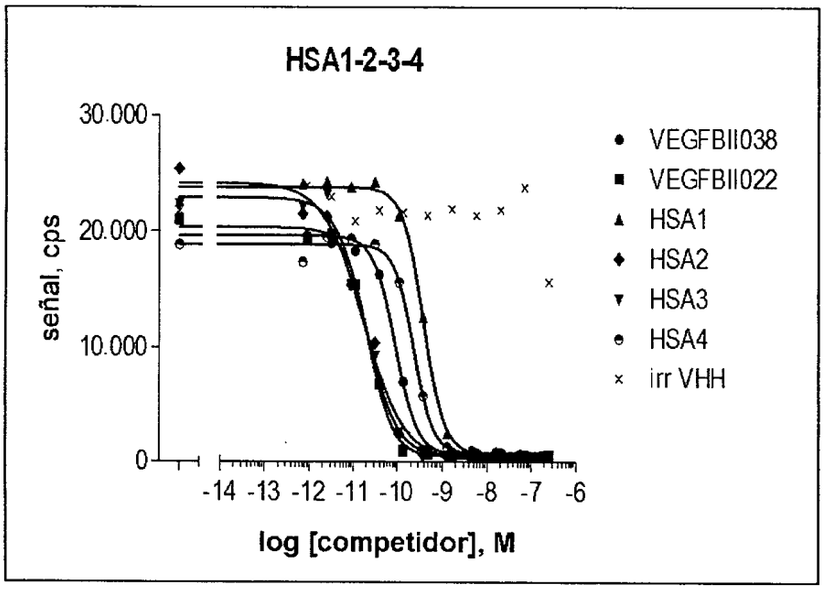

VEGFBII022
30.000
20.000
10.000
0
señal, cps
- HSA
+ HSA
-14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competidor], log

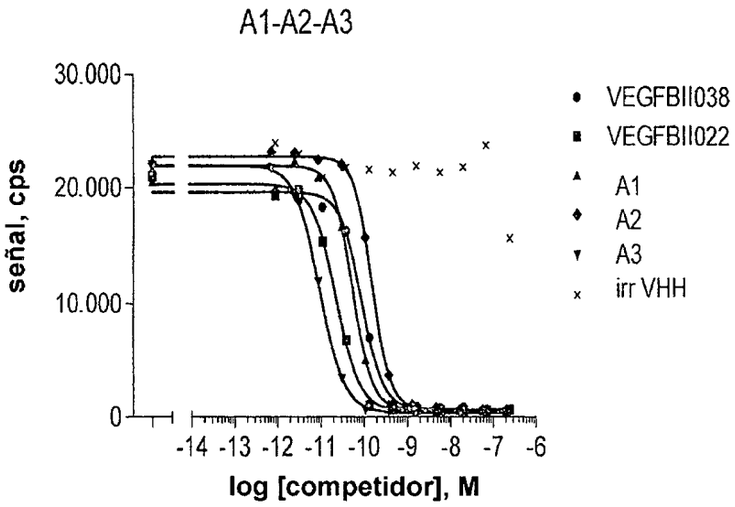
Figura 49-2





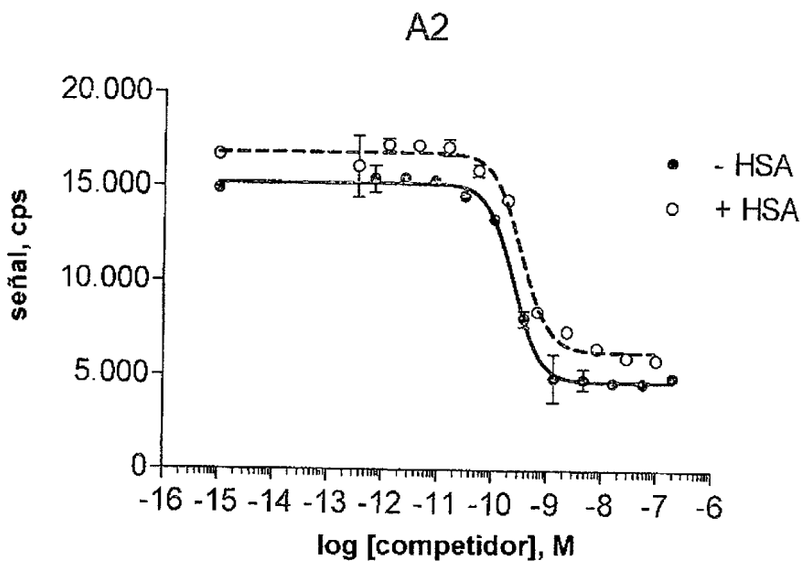
433
437

Figura 49-3



434
435

Figura 50-1


A2
20.000
15.000
10.000
5.000
0
señal, cps
- HSA
+ HSA
-16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competidor], M

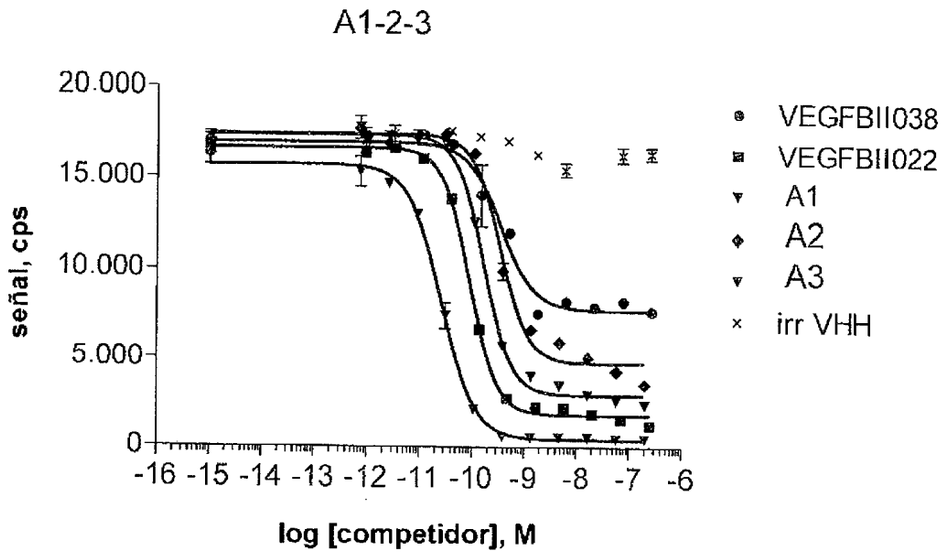

A1-2-3
20.000
15.000
10.000
5.000
0
señal, cps
VEGFBII038
VEGFBII022
A1
A2
A3
irr VHH
-16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competidor], M

Figura 50-2

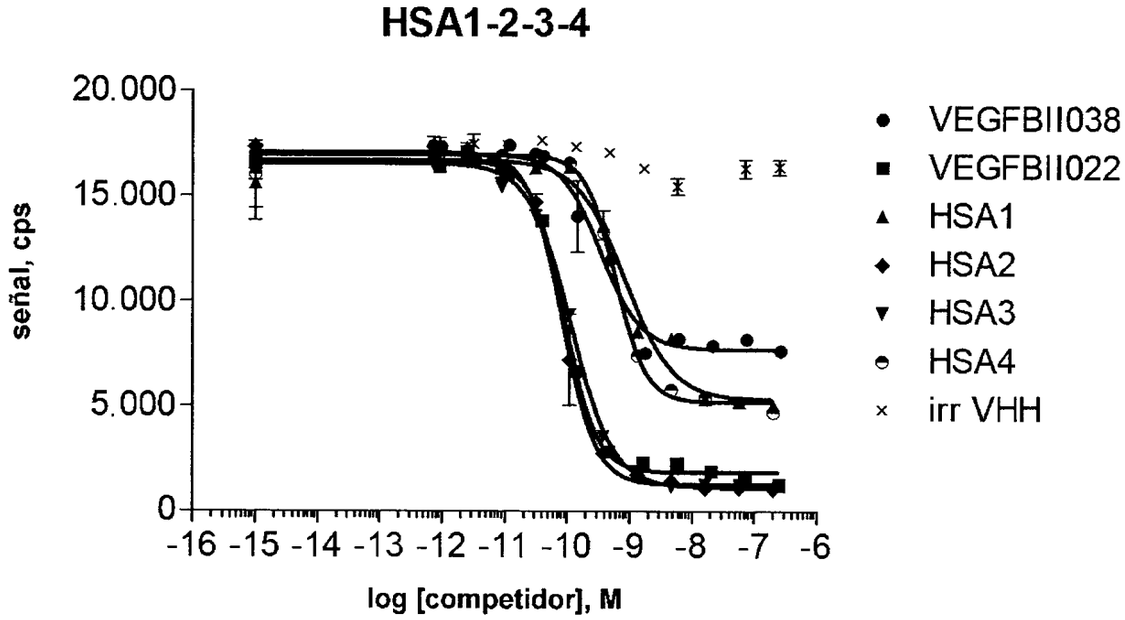
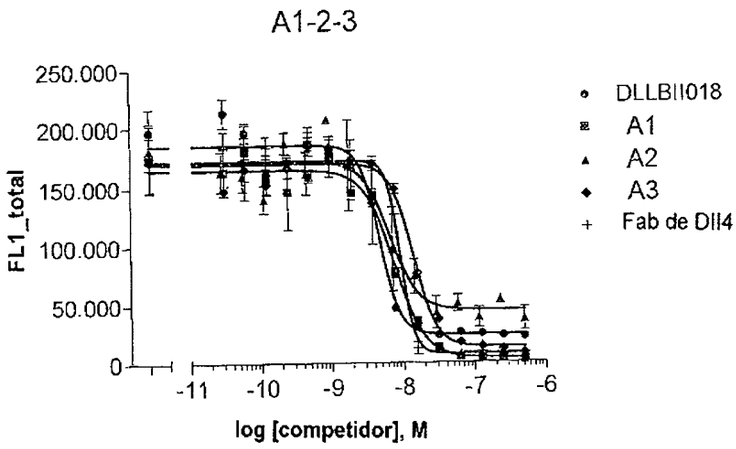

HSA1-2-3-4
20.000
15.000
10.000
5.000
0
señal, cps
-16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
log [competidor], M
VEGFBII038
VEGFBII022
HSA1
HSA2
HSA3
HSA4
irr VHH

Figura 51-1

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

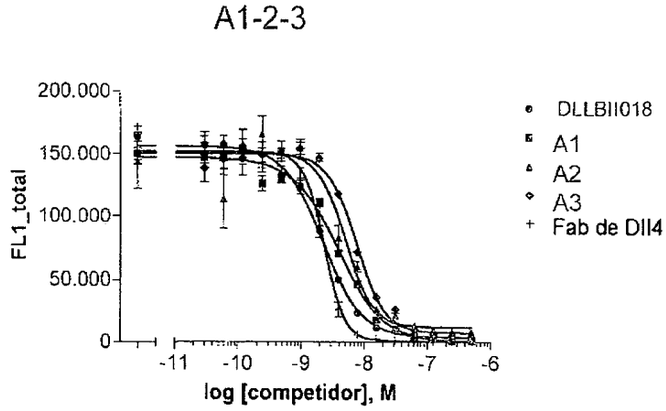
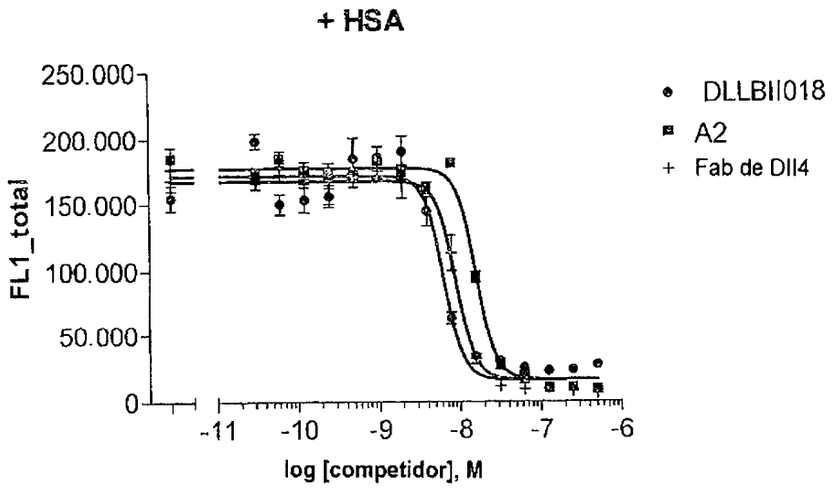


Figura 51-2

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1

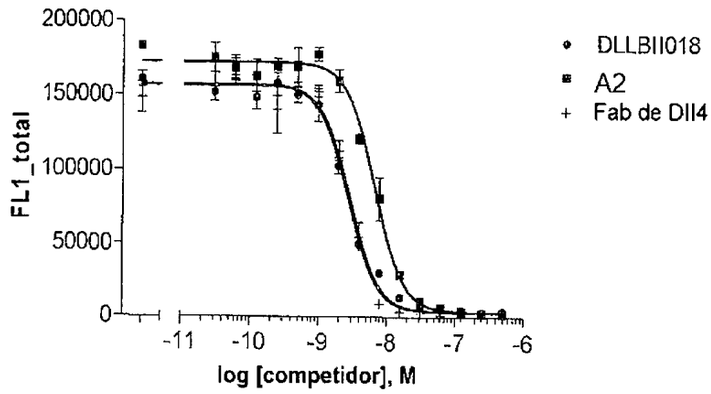
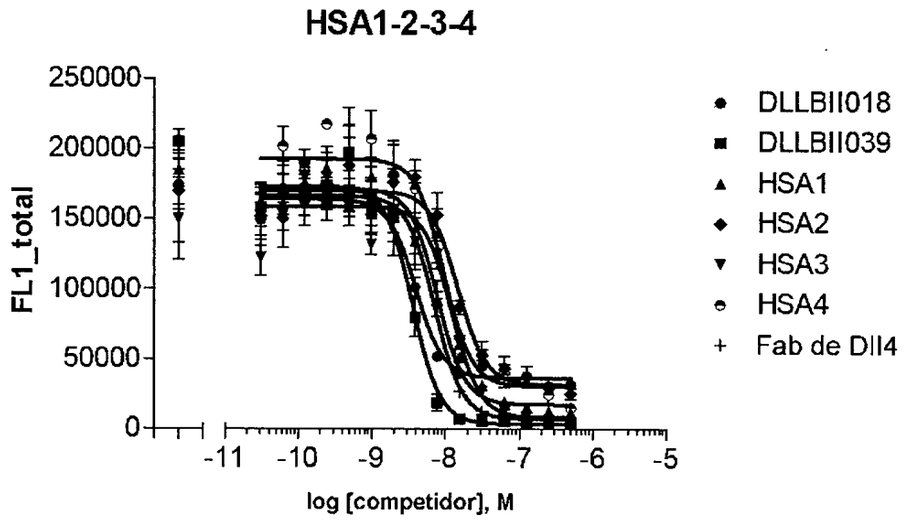
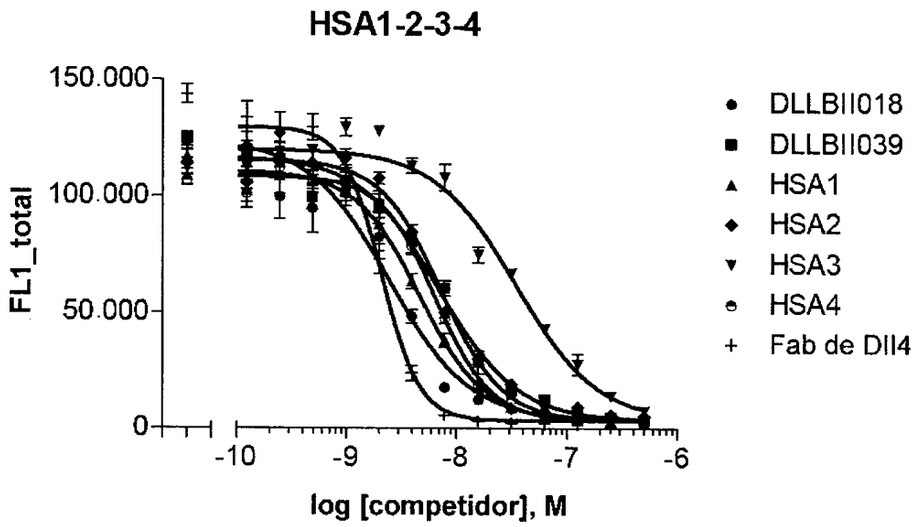


Figura 51-3

FMAT de Fc-CHO-hDLL4/hNotch1



FMAT de Fc-CHO-mDLL4/hNotch1



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN BIOESPECÍFICAS PARA LA TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS

<130> 12-0308-prio-2

<160> 102

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser Arg, Ala o Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa puede ser Leu o Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa puede ser Tyr o His

<400> 1

Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Xaa Pro Tyr Xaa Tyr Asp Xaa
1 5 10

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<220>

440

<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa puede ser Gln, Ala o Tyr

<400> 2

Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala Tyr Xaa
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Lama glama

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa puede ser Asp o Glu

<400> 3

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Xaa
1 5 10 15

Tyr

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ile Ser Gly Phe Thr Leu Asp Leu His
20 25 30

Val Ile Gly Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
35 40 45

441
440

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

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

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

Ala Ala Pro Trp Asp Ser Trp Tyr Cys Gly Ile Gly Asn Asp Tyr Asp
100 105 110

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

<210> 5
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 5

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

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

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

Ala Val Ile Ser Asn Gly Gly Ile Thr Asn Tyr Pro Asn Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Pro Thr Asp Val His Glu Tyr Asp Tyr

442
~~441~~

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 6

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

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

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

Ala Ala Phe Ser Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Pro Thr Asp Val Phe Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 130
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 7

443
~~492~~

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

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

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

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

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

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

Ala Ala His Pro Leu Gln Asn Cys Cys Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Ser
            100                 105                 110

Pro Glu Ala Val Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
        115                 120                 125

Ser Ser
    130
```

<210> 8
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 8

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

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

Asn Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

449

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

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

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

Ala Ala Pro Phe Ala Tyr Tyr Ser Asn Leu Cys Gly Val Asn Gly Tyr
100 105 110

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

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 9

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

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

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

Ser Cys Ile Ser Ser His Asp Arg Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Pro Leu Val Cys Gly Tyr Asn Asp Pro Arg Leu Ala Asp
100 105 110

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

<210> 10
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 10

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Ala Asp Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 128
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 12

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Phe Val

447
446

50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Arg Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13
<211> 117
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 13

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

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

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

Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ser Val His Pro Ser Thr Gly Phe Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

448

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 14

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Gly Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Pro Gly Ile Ala Ala Cys Arg Gly Ile His Tyr Thr Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 15

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

449
~~448~~

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Gly Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Pro Gly Ile Ala Ala Cys Arg Gly Ile His Tyr Thr Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 16

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Gly Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Pro Gly Ile Ala Ala Cys Arg Gly Ile His Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 17

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Glu Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Pro Gly Ile Ala Ala Cys Arg Gly Ile His Tyr Thr Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 116
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Gly Ser Trp Gly Val His Gly Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Tyr

452
451

20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Pro Arg Gly Trp Gly Pro Thr Gly Pro His Glu Tyr Gly Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 20

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Gly Ile
35 40 45

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

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

453
452

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

Ala Thr Pro Gly Ile Ala Ala Cys Arg Gly Ile His Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 21

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Arg Pro Tyr Leu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

454
9-23-

<210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 22

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 23

455
454

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Glu Pro Tyr Leu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 24

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

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

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

4156
455

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Arg Pro Tyr Leu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 25

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

457
456

85 90 95

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 26

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Leu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

C15E
457

<210> 27
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 27

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

459
~~458~~

1 5 10 15

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 29

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

460
~~459~~

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 30
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 30

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

461
~~460~~

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 31

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 32
<211> 128

462
481

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 32

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 33
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 33

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

463
~~462~~

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 34
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 34

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 35

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His

465
~~464~~

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 36

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 37
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

466
-485

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 37

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 38
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 38

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr

462
466

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 39
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 39

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

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

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

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

468

~~469~~

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 40
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 40

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 41
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 41

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 42
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 42

420
469

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 43

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu

50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

<210> 44
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 44

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

472
471

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

<210> 45
<211> 113
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 45

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
20 25 30

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

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe
85 90 95

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 46
<211> 124
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 46

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met Ala Arg Asp Asn Tyr Arg
100 105 110

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

<210> 47
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 47

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

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

Arg Met Gly Trp Phe Arg Arg Thr Pro Gly Lys Glu Asp Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Trp Thr Tyr Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Gly Ala Gln Ser Asp Arg Tyr Asn Ile Arg Ser Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 285
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp
165 170 175

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
180 185 190

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
195 200 205

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
210 215 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225 230 235 240

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
245 250 255

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
260 265 270

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 49
<211> 247
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de

476
475

lama glama

<400> 49

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
145 150 155 160

Ile Arg Phe Met Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys His
165 170 175

Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val
180 185 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 50
<211> 278
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 50

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

478
977

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
165 170 175

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile
180 185 190

Arg Phe Met Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys His Arg
195 200 205

Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val Asp
210 215 220

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
225 230 235 240

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
245 250 255

Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr
260 265 270

Gln Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 51
<211> 289
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
165 170 175

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg
180 185 190

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
195 200 205

480
479

Glu Arg Val Leu Val Ala Asp Ile Ser Ser Ser Gly Ile Asn Thr Tyr
210 215 220

Val Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
225 230 235 240

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
245 250 255

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met Ala
260 265 270

Arg Asp Asn Tyr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
275 280 285

Ser

<210> 52
<211> 288
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

481
480

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
165 170 175

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ser
180 185 190

Ala Phe Lys Ser Tyr Arg Met Gly Trp Phe Arg Arg Thr Pro Gly Lys
195 200 205

Glu Asp Glu Phe Val Ala Ser Ile Ser Trp Thr Tyr Gly Ser Thr Phe
210 215 220

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Lys Ala
225 230 235 240

Lys Asn Ala Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
245 250 255

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ala Gln Ser Asp Arg Tyr Asn Ile
260 265 270

Arg Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

482
~~481~~

275 280 285

<210> 53
<211> 289
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met Ala Arg Asp Asn Tyr Arg
100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160

483
487

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
165 170 175

Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr
180 185 190

Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu
195 200 205

Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser
210 215 220

Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn
225 230 235 240

Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
245 250 255

Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu
260 265 270

Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
275 280 285

Ser

<210> 54
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 54

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 55

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu

485
484

65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 56
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 56

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 57

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 58
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

1482
~~480~~

<400> 58

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 59
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

488
981

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 60
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 61
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 61

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

490
489

<210> 62
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

<210> 63
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 63

491
990

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 64
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 64

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

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

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

492
491

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 65
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
20 25 30

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

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe

493
492

85 90 95

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 66
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Ile Ser Met
20 25 30

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

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe
85 90 95

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 67
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Arg Phe Ile Ser Met
20 25 30

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

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe
85 90 95

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 68
<211> 283
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 68

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Asn Arg Ala Ala Asp Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
            100                 105                 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145                 150                 155                 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu
                165                 170                 175

Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met
            180                 185                 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala
        195                 200                 205

Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg
```

496
495

210 215 220

Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile
225 230 235 240

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser
245 250 255

Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr
260 265 270

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 69
<211> 283
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

497
496

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
165 170 175

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
180 185 190

Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
195 200 205

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
210 215 220

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Ala Asn Arg Ala Ala Asp Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
260 265 270

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 70
<211> 402
<212> PRT
<213> Artificial

498
497

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 70

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ala Trp Phe
180 185 190

449
998

```
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Arg Trp
        195                 200                 205

Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr
    210                 215                 220

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
225                 230                 235                 240

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Ala
                245                 250                 255

Asp Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            260                 265                 270

Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
        275                 280                 285

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
    290                 295                 300

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
305                 310                 315                 320

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
                325                 330                 335

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
            340                 345                 350

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
        355                 360                 365

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
    370                 375                 380

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
385                 390                 395                 400
```

800
799

Ser Ser

<210> 71
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

501
500

145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
275 280 285

Ser Tyr Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

Phe Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp
305 310 315 320

Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Ala Asp Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Glu Tyr
355 360 365

502
501

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 72
<211> 402
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 72

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Ala Asp Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

503

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu
                165                 170                 175

Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln
            180                 185                 190

Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly
        195                 200                 205

Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys
    210                 215                 220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro
225                 230                 235                 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser
                245                 250                 255

Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            260                 265                 270

Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
        275                 280                 285

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
    290                 295                 300

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
305                 310                 315                 320

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
                325                 330                 335

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
            340                 345                 350

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
```

504
503

355 360 365

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
370 375 380

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
385 390 395 400

Ser Ser

<210> 73
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 73

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Ala Ala Asp Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

505
504

```
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    130                 135                 140

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145                 150                 155                 160

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                165                 170                 175

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            180                 185                 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        195                 200                 205

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    210                 215                 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                245                 250                 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp
            260                 265                 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
        275                 280                 285

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
    290                 295                 300

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
305                 310                 315                 320
```

506
505

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
325 330 335

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
340 345 350

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
355 360 365

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 74
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

502
~~568~~

```
Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145                 150                 155                 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                165                 170                 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
            180                 185                 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        195                 200                 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225                 230                 235                 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
            260                 265                 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
        275                 280                 285

Ser Tyr Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
    290                 295                 300

Tyr Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp
305                 310                 315                 320
```

508
507

Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr
355 360 365

Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 75
<211> 386
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr

509
508

100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly
275 280 285

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu
290 295 300

Trp Val Ser Ser Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
305 310 315 320

510

Tyr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
325 330 335

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp
355 360 365

Gly Ala Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
370 375 380

Ser Ser
385

<210> 76
<211> 288
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

511
510

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
165 170 175

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
180 185 190

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
195 200 205

Ser Ser Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Tyr Val
210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
260 265 270

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 77

512
511

<211> 283
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
165 170 175

513
512

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
180 185 190

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val
195 200 205

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
210 215 220

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His
260 265 270

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 78
<211> 405
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 78

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu

514
513

50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
145 150 155 160

Ile Arg Phe Met Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys His
165 170 175

Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val
180 185 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
260 265 270

515
519

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
275 280 285

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
290 295 300

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ala Trp Tyr Arg
305 310 315 320

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser
325 330 335

Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile
340 345 350

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
355 360 365

Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Pro Asp
370 375 380

Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Gln
385 390 395 400

Val Thr Val Ser Ser
405

<210> 79
<211> 431
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 79

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

516
545

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
165 170 175

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
180 185 190

Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys His Arg Glu Leu Val Ala Arg
195 200 205

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
210 215 220

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met

572
576

225 230 235 240

Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe
245 250 255

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
275 280 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
305 310 315 320

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
325 330 335

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
340 345 350

Arg Glu Tyr Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr
355 360 365

Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
370 375 380

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
385 390 395 400

Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr
405 410 415

Glu Tyr Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
420 425 430

<210> 80
<211> 407

518
517

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias de lama glama.

<400> 80

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
165 170 175

J19
P518

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
180 185 190

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val
195 200 205

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
210 215 220

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His
260 265 270

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
275 280 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
290 295 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305 310 315 320

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
325 330 335

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
340 345 350

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
355 360 365

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
370 375 380

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly

520
519

385 390 395 400

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
405

<210> 81
<211> 282
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama.

<400> 81

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

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

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

Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu Gly
50 55 60

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

Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
85 90 95

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu
100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

521
520

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
180 185 190

Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val Ala
195 200 205

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
210 215 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225 230 235 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
245 250 255

Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His Trp
260 265 270

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 82
<211> 380
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama.

<400> 82

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser

522
521

20 25 30

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

Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu Gly
50 55 60

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

Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
85 90 95

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu
100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
130 135 140

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145 150 155 160

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
165 170 175

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
180 185 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
195 200 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225 230 235 240

523
522

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
260 265 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser
275 280 285

Tyr Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr
290 295 300

Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
305 310 315 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
325 330 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
340 345 350

Cys Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp
355 360 365

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 83
<211> 430
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama.

<400> 83

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

524
~~523~~

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

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

Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu Gly
50 55 60

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

Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
85 90 95

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu
100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Arg Phe Ile Ser Met Ala
180 185 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile
195 200 205

Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn

525
~~529~~

225 230 235 240

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser
245 250 255

Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
290 295 300

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
305 310 315 320

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
325 330 335

Ser Ser Tyr Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
340 345 350

Glu Tyr Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala
355 360 365

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
370 375 380

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
385 390 395 400

Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu
405 410 415

Tyr Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425 430

<210> 84
<211> 868

526
825

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama.

<400> 84

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
165 170 175

527
526

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
180 185 190

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val
195 200 205

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His
260 265 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Ala His Lys Ser
275 280 285

Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala
290 295 300

Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu
305 310 315 320

Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys
325 330 335

Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu
340 345 350

Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly
355 360 365

Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys
370 375 380

Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg

525
527

385 390 395 400

Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr
405 410 415

Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe
420 425 430

Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe
435 440 445

Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys
450 455 460

Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg
465 470 475 480

Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala
485 490 495

Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala
500 505 510

Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys
515 520 525

Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala
530 535 540

Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu
545 550 555 560

Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val
565 570 575

Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe
580 585 590

Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
595 600 605

529
528

```
Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr
    610                 615                 620

Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
625                 630                 635                 640

Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val
                645                 650                 655

Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys
            660                 665                 670

Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn
        675                 680                 685

Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
    690                 695                 700

Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys
705                 710                 715                 720

Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
                725                 730                 735

Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val
            740                 745                 750

Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
        755                 760                 765

Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
    770                 775                 780

Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
785                 790                 795                 800

Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
                805                 810                 815
```

530
529

Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
820 825 830

Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
835 840 845

Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
850 855 860

Ala Leu Gly Leu
865

<210> 85
<211> 990
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama.

<400> 85

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr

```
                100                 105                 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ile Arg Phe Ile Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
                165                 170                 175

Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala
            180                 185                 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
        195                 200                 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
    290                 295                 300

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ala Trp Tyr Arg
305                 310                 315                 320
```

532
~~531~~

```
Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser
                325                 330                 335

Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
            340                 345                 350

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        355                 360                 365

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Pro Asp
    370                 375                 380

Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
385                 390                 395                 400

Val Thr Val Ser Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
                405                 410                 415

Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
            420                 425                 430

Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
        435                 440                 445

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
    450                 455                 460

Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
465                 470                 475                 480

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
                485                 490                 495

Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
            500                 505                 510

Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
        515                 520                 525
```

533
532

Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
530 535 540

Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
545 550 555 560

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
565 570 575

Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
580 585 590

Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
595 600 605

Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
610 615 620

Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
625 630 635 640

Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
645 650 655

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
660 665 670

Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
675 680 685

Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
690 695 700

Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
705 710 715 720

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
725 730 735

534
533

```
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
            740                 745                 750

Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
        755                 760                 765

Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
    770                 775                 780

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
785                 790                 795                 800

Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
                805                 810                 815

Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
            820                 825                 830

Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
        835                 840                 845

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
    850                 855                 860

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
865                 870                 875                 880

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
                885                 890                 895

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
            900                 905                 910

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
        915                 920                 925

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
    930                 935                 940

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
```

945 950 955 960

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
965 970 975

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
980 985 990

<210> 86
<211> 995
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama.

<400> 86

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
100 105 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

536
535

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                165                 170                 175

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
            180                 185                 190

Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
        195                 200                 205

Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val
    210                 215                 220

Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
225                 230                 235                 240

Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                245                 250                 255

Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala
            260                 265                 270

Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
305                 310                 315                 320

Ala Ser Gly Ile Arg Phe Ile Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
                325                 330                 335
```

537
536

```
Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr
            340                 345                 350

Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        355                 360                 365

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
    370                 375                 380

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp
385                 390                 395                 400

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Ala His Lys Ser Glu
                405                 410                 415

Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu
            420                 425                 430

Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp
        435                 440                 445

His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val
    450                 455                 460

Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe
465                 470                 475                 480

Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu
                485                 490                 495

Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe
            500                 505                 510

Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro
        515                 520                 525

Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe
    530                 535                 540

Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr
```

538
537

545 550 555 560

Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr
565 570 575

Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu
580 585 590

Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu
595 600 605

Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp
610 615 620

Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu
625 630 635 640

Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys
645 650 655

His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys
660 665 670

Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys
675 680 685

Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu
690 695 700

Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val
705 710 715 720

Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe
725 730 735

Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser
740 745 750

Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu
755 760 765

539
538

```
Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe
    770                 775                 780

Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln
785                 790                 795                 800

Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala
                805                 810                 815

Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr
            820                 825                 830

Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys
        835                 840                 845

Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser
    850                 855                 860

Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser
865                 870                 875                 880

Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro
                885                 890                 895

Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe
            900                 905                 910

Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu
        915                 920                 925

Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys
    930                 935                 940

His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp
945                 950                 955                 960

Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr
                965                 970                 975
```

540
539

Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala
980 985 990

Leu Gly Leu
995

<210> 87
<211> 903
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama.

<400> 87

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

```
    130                 135                 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145                 150                 155                 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
                165                 170                 175

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            180                 185                 190

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val
        195                 200                 205

Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    210                 215                 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
225                 230                 235                 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                245                 250                 255

Ala Asn Arg Ala Pro Asp Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala
305                 310                 315                 320

His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
                325                 330                 335

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys
            340                 345                 350
```

542
541

```
Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
        355                 360                 365

Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu
    370                 375                 380

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu
385                 390                 395                 400

Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg
                405                 410                 415

Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
            420                 425                 430

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn
        435                 440                 445

Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His
    450                 455                 460

Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys
465                 470                 475                 480

Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu
                485                 490                 495

Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala
            500                 505                 510

Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala
        515                 520                 525

Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala
    530                 535                 540

Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His
545                 550                 555                 560
```

543
~~592~~

```
Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala
                565                 570                 575

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys
            580                 585                 590

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile
        595                 600                 605

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala
    610                 615                 620

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
625                 630                 635                 640

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
                645                 650                 655

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
            660                 665                 670

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
        675                 680                 685

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
    690                 695                 700

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
705                 710                 715                 720

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
                725                 730                 735

Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
            740                 745                 750

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
        755                 760                 765
```

544
543

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
770 775 780

Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
785 790 795 800

Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
805 810 815

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
820 825 830

Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
835 840 845

Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
850 855 860

Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
865 870 875 880

Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
885 890 895

Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
900

<210> 88
<211> 1025
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama

<400> 88

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

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

515
519

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
    50                  55                  60

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

Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
            100                 105                 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ile Arg Phe Ile Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
                165                 170                 175

Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala
            180                 185                 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
        195                 200                 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240
```

546
5-9-5

```
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
    290                 295                 300

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ala Trp Tyr Arg
305                 310                 315                 320

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Tyr Val Ala Ala Ile Arg Trp Ser
                325                 330                 335

Gly Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
            340                 345                 350

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        355                 360                 365

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Ala Pro Asp
    370                 375                 380

Thr Arg Leu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
385                 390                 395                 400

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                405                 410                 415

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            420                 425                 430

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
        435                 440                 445
```

547
548

```
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
    450                 455                 460

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
465                 470                 475                 480

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
                485                 490                 495

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
            500                 505                 510

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
        515                 520                 525

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
    530                 535                 540

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
545                 550                 555                 560

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
                565                 570                 575

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
            580                 585                 590

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
        595                 600                 605

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
    610                 615                 620

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
625                 630                 635                 640

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
                645                 650                 655

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
```

548
F47

660 665 670

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
675 680 685

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
690 695 700

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
705 710 715 720

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
725 730 735

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
740 745 750

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
755 760 765

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
770 775 780

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
785 790 795 800

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
805 810 815

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
820 825 830

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
835 840 845

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
850 855 860

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
865 870 875 880

549
~~548~~

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
885 890 895

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
900 905 910

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
915 920 925

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
930 935 940

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
945 950 955 960

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
965 970 975

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
980 985 990

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
995 1000 1005

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
1010 1015 1020

Gly Leu
1025

<210> 89
<211> 1030
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido artificial que comprende las secuencias derivadas de lama glama

<400> 89

550
549

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Trp Ala Arg Gln Gly Glu Tyr Trp Gly Ala
            100                 105                 110

Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                165                 170                 175

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
            180                 185                 190

Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
        195                 200                 205

Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val
```

551
550

```
        210                 215                 220

Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
225                 230                 235                 240

Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                245                 250                 255

Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala
            260                 265                 270

Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
305                 310                 315                 320

Ala Ser Gly Ile Arg Phe Ile Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
                325                 330                 335

Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr
            340                 345                 350

Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        355                 360                 365

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
    370                 375                 380

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp
385                 390                 395                 400

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                405                 410                 415

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            420                 425                 430
```

552

551

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His
        435                 440                 445

Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe
    450                 455                 460

Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro
465                 470                 475                 480

Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys
                485                 490                 495

Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His
            500                 505                 510

Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr
        515                 520                 525

Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
    530                 535                 540

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu
545                 550                 555                 560

Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu
                565                 570                 575

Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro
            580                 585                 590

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
        595                 600                 605

Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu
    610                 615                 620

Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
625                 630                 635                 640
```

553
552

```
Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
                645                 650                 655

Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
            660                 665                 670

Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
        675                 680                 685

Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
    690                 695                 700

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
705                 710                 715                 720

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
                725                 730                 735

Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
            740                 745                 750

Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
        755                 760                 765

Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
    770                 775                 780

Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
785                 790                 795                 800

Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
                805                 810                 815

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
            820                 825                 830

Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
        835                 840                 845
```

554
553

Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
850 855 860

Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
865 870 875 880

Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
885 890 895

Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
900 905 910

Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
915 920 925

Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
930 935 940

Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
945 950 955 960

Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
965 970 975

Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val
980 985 990

Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp
995 1000 1005

Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
1010 1015 1020

Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
1025 1030

<210> 90
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 90

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 91

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 92
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 92

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 93

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 94
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 94

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 95
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20 25

<210> 96
<211> 35
<212> PRT

552
558

<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 96

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 97
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador sintético.

<400> 97

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 98
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia mutada de lama glama

<400> 98

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

559
559

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 99
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

```
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65                  70                  75                  80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
                85                  90                  95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
            100                 105                 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
        115                 120                 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
    130                 135                 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
                165                 170                 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
            180                 185                 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
        195                 200                 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
    210                 215                 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225                 230                 235                 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
                245                 250                 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
            260                 265                 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
```

560

559

275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

561
560

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 100
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

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

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

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

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

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

562
561

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

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 101
<211> 687
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

His Met Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe
20 25 30

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser
35 40 45

Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu
50 55 60

Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr
65 70 75 80

Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp
85 90 95

Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr
100 105 110

Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly
115 120 125

Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys
130 135 140

Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp
145 150 155 160

563
562

```
Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile
                165                 170                 175

Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys
            180                 185                 190

Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu
        195                 200                 205

Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys
    210                 215                 220

Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu
225                 230                 235                 240

Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile
                245                 250                 255

Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys
            260                 265                 270

Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn
        275                 280                 285

Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn
    290                 295                 300

Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly
305                 310                 315                 320

Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg
                325                 330                 335

Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys
            340                 345                 350

Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys
        355                 360                 365
```

```
Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln
    370                 375                 380

Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn
385                 390                 395                 400

Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly
                405                 410                 415

Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro
            420                 425                 430

Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg
        435                 440                 445

Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu
    450                 455                 460

Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg
465                 470                 475                 480

Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr
                485                 490                 495

Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr
            500                 505                 510

Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser
        515                 520                 525

Phe Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu
    530                 535                 540

Val Leu Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg
545                 550                 555                 560

Arg Pro Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe
                565                 570                 575
```

Gln Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln
580 585 590

Lys Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly
595 600 605

Lys Gln Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu
610 615 620

Gly Arg Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu
625 630 635 640

Gly Glu Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg
645 650 655

Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys
660 665 670

Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
675 680 685

<210> 102
<211> 707
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 102

Met Ala Cys Ala Cys Ala Met Leu Ala Thr Thr Ala Arg His Glu Ser
1 5 10 15

Ser Met Asn Lys Glu Tyr Met Ala Ala Ala Ser Trp Ser Ala Ser Gly
20 25 30

Trp Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly
35 40 45

Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Val Asn Glu Arg Gly
50 55 60

Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe
65 70 75 80

566
585

```
Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ser Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala
            100                 105                 110

Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro
        115                 120                 125

Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp
    130                 135                 140

His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala
145                 150                 155                 160

Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn
                165                 170                 175

Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser
            180                 185                 190

Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg
        195                 200                 205

Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro
    210                 215                 220

Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln
225                 230                 235                 240

Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser
                245                 250                 255

Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys
            260                 265                 270

Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr
        275                 280                 285
```

567

```
Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp
    290                 295                 300

Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala
305                 310                 315                 320

Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro
                325                 330                 335

Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser
            340                 345                 350

Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr
        355                 360                 365

His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser
    370                 375                 380

Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg
385                 390                 395                 400

Glu Arg Asn Gln Gly Ala Ser Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe
                405                 410                 415

Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro
            420                 425                 430

Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys
        435                 440                 445

Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Arg His Val Ser
    450                 455                 460

Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu
465                 470                 475                 480

Glu Ser Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg
                485                 490                 495
```

568
567

```
Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe
            500                 505                 510

Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys
        515                 520                 525

Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly
    530                 535                 540

Leu Pro Pro Ser Phe Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu
545                 550                 555                 560

Ala Val Leu Leu Val Leu Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln
                565                 570                 575

Leu Arg Leu Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn
            580                 585                 590

Leu Ser Asp Phe Gln Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys
        595                 600                 605

Asn Thr Asn Gln Lys Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys
    610                 615                 620

Ser Asn Cys Gly Lys Gln Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala
625                 630                 635                 640

Pro Gly Pro Leu Gly Arg Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser
                645                 650                 655

Asp Lys Ser Leu Gly Glu Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys
            660                 665                 670

Pro Glu Cys Arg Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr
        675                 680                 685

Gln Ser Val Cys Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala
    690                 695                 700

Thr Glu Val
```

569
5-68

705

570
569

PATENT COOPERATION TREATY PCT/EP2010/064695

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

HAMMANN, Heinz, et al.
BOEHRINGER INGELHEIM GMBH
Corporate Patents
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim Am Rhein
ALLEMAGNE

Date of mailing *(day/month/year)*
07 March 2012 (07.03.2012)

Applicant's or agent's file reference
12-0308-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2010/064695

International filing date *(day/month/year)*
01 October 2010 (01.10.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
BOUCNEAU, Joachim Gulden-Vlieslaan 64 bus 4, B-8000 Brugge Belgium	BE	BE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
BOUCNEAU, Joachim Salviapark 1 bus 1 B-9840 De Pinte Belgium	BE	BE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Authorized officer
Villechaise Patrick
e-mail pt06.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 06

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-056244- -00000-0000
Fecha: 2012-04-03 17:15:49 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 571

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☑ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☑ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐