

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos que inhiben CD40L

### 5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a inmunoglobulinas que se unen a CD40L y más en particular a polipéptidos, que comprenden o consisten esencialmente en una o más de tales inmunoglobulinas (también denominadas en la presente invención "inmunoglobulina o  
10 inmunoglobulinas de la invención", y "polipéptidos de la invención", respectivamente).

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos (también denominados en la presente memoria como "ácido nucleico o ácidos nucleicos de la invención", a métodos para preparar tales polipéptidos, a células huésped que expresan o  
15 son capaces de expresar tales polipéptidos, a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales polipéptidos, ácidos nucleicos y/o células huésped, y a los usos de polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y/o composiciones, en particular con fines profilácticos y/o terapéuticos, tal como los fines profiláctico y/o terapéutico mencionados en la presente memoria.

20 Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención quedarán claros a partir de la descripción adicional en este documento.

### 25 2. Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que las interacciones CD40/CD40 ligando (CD40L, CD154) juegan un papel crucial en el inicio (Grewal y Flavell, 1998 Annu. Rev. Immunol. 16: 111-135; Yang y Wilson, 1996 Science 273: 1862-1864) y mantenimiento (Grewal et al., 1996 Science 273: 1864-1867; Buhmann et al., 1999 J. Immunol. 162: 4373- 4376) de respuestas de células B y T. La molécula coestimuladora CD40 se expresa en la superficie de una variedad de células presentadoras de antígeno (APC) que incluyen células dendríticas (DC), linfocitos B, macrófagos y subconjuntos de progenitores de células CD34<sup>+</sup> ya sea constitutivamente o después de activación *in vitro* (McLellan et al., 1996 Eur. J. Immunol. 26: 1204-1210; Rondelli et al., 1999 Blood 94: 2293-2300). CD40L se expresa en la superficie de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y algunos CD8<sup>+</sup> después de estimulación mediada por el receptor de células T. La interacción entre CD40 y CD40L conduce a señales bidireccionales que afectan tanto a la función de APC como de las células T. Por un lado, la estimulación dependiente de CD40L de CD40 induce DC y macrófagos para expresar moléculas coestimuladoras de células T tales como CD80 y CD86, y para producir citoquinas inmunoestimuladoras tales como IL-12, aumentando así su capacidad de iniciar tanto respuestas de células T auxiliares como citotóxicas (Kennedy et al., 1994 Eur. J. Immunol., 24: 116-123; Caux et al., 1994 J. Exp. Med. 180: 1263-1272). Por otro lado, la estimulación dependiente de CD40 de CD40L produce una señal coestimuladora (Brenner et al., 1997 FEBS Letters 417: 301-306) que contribuye a la activación de células T (Koppenhoefer et al., 1997 FEBS Letters 414: 444-448; Blotta et al., 1996 J. Immunol. 156: 3133-3140). La evidencia de modelos animales y humanos respalda un papel esencial de las interacciones CD40-CD40L en la generación de autoanticuerpos patógenos y lesiones tisulares en una variedad de enfermedades autoinmunes, tales como nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS), también conocida  
45 como enfermedad de Lou Gehrig y enfermedad de Charcot. Estos hallazgos impulsaron el desarrollo de anticuerpos que alteran la interacción CD40-CD40L.

Se ha demostrado que un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) dirigido contra CD40L humana (hu5C8 o ruplizumab, Biogen) induce la supervivencia del injerto a largo plazo en la

mayoría de los receptores en un modelo de primate no humano de trasplante de riñón de donantes que no coinciden en su MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) (Kirk et al., 1999 Nat. Med. 5: 686-693). El mismo anticuerpo también se ha probado en un ensayo de fase II en la nefritis lúpica. Sin embargo, el estudio tuvo que terminarse prematuramente debido a eventos tromboembólicos (TE), incluidos infartos de miocardio (Kawai et al., 2000 Nat. Med. 6: 114).

El anticuerpo anti-CD40L humanizado toralizumab (IDEC-131, hu24-31) del isotipo IgG1 se deriva del hibridoma 24-31 anti-CD40L de murino. Al igual que el ruplizumab, el ensayo múltiple de fase I y fase II que se planeó para toralizumab también se detuvo debido al riesgo de eventos tromboembólicos en pacientes humanos.

Un tercer anticuerpo anti-CD40L desarrollado fue ABI793, que es una IgG1 humana derivada de ratones HuMAb (Medarex Inc.). En este caso, ya se observaron TE en los modelos de trasplante renal de rhesus y cynomolgus, por lo que se detuvo el desarrollo posterior de ABI793.

Los eventos tromboembólicos pueden desarrollarse con anticuerpos contra diferentes epítomos, en diversos entornos de enfermedad e implican tanto a los territorios venosos como a los arteriales en diversos sitios, incluyendo miocardio, arteria pulmonar y venas periféricas. El mecanismo exacto que subyace al TE inducido por anti-CD40L, sin embargo, aún no se ha dilucidado. Las principales hipótesis son:

- (i) entrecruzamiento de CD40L en plaquetas debido a la naturaleza bivalente del anticuerpo monoclonal IgG;
- (ii) Interacción del anticuerpo anti-CD40L con los receptores de Fc plaquetarios, promoviendo así la agregación plaquetaria y la trombosis.

Además, las respuestas inmunes a productos proteicos terapéuticos tales como anticuerpos preexistentes (PEA) y/o anticuerpos antifármacos (ADA) pueden plantear problemas tanto para la seguridad del paciente como para la eficacia del producto. Estos eventos adversos de base inmunológica incluyen anafilaxis, síndrome de liberación de citoquina, "reacciones de infusión" y reacciones no agudas (aparición tardía de fiebre, erupción cutánea, artralgia, mialgia, hematuria, proteinuria, serositis, complicaciones del sistema nervioso central y anemia hemolítica) así como neutralización de reactividad cruzada de proteínas endógenas que median funciones críticas. Las respuestas inmunitarias no deseadas a productos proteicos terapéuticos también pueden neutralizar sus actividades biológicas y dar como resultado eventos adversos no solo inhibiendo la eficacia del producto proteico terapéutico, sino también mediante reacción cruzada con un homólogo de proteína endógena, lo que conduce a la pérdida de su función fisiológica. Las consecuencias de seguridad de la inmunogenicidad pueden variar ampliamente y a menudo son impredecibles en pacientes a los que se les administran productos proteicos terapéuticos. PEA y ADA pueden tener graves consecuencias si reaccionan de forma cruzada e inhiben una contraparte endógena no redundante del producto proteico terapéutico o proteínas relacionadas (Macdougall et al., 2012 Kidney Int. 2012 81: 727-32; Seidl et al., 2012 Pharm Res 29: 1454-1467).

El documento WO2013/056068 se refiere a proteínas de fusión diméricas compuestas por un fragmento de Fc modificado de IgG1 unido al C-terminal de un anticuerpo de dominio (dAb) dirigido contra CD40L. El documento WO2013/056068 no informó sobre PEA, pero informa que en monos se desarrollaron ADA contra la proteína, lo que dio como resultado una eliminación rápida (baja exposición en plasma y baja  $T_{1/2}$  e suero).

No se han publicado informes sobre anticuerpos de dominio variable único de inmunoglobulina suficientemente efectivos. Biogen y UCB están colaborando actualmente

para rediseñar un anticuerpo anti-CD40L preexistente como una molécula de Fab'-PEG (CDP7657) que intenta superar los eventos TE observados con hu5C8. Para prolongar la semivida, la fracción Fab' se acopló con polietilenglicol (PEG). PEG tiene una amplia variedad de aplicaciones, desde fabricación industrial hasta medicina, por lo que se usa de manera omnipresente. Un hallazgo reciente demostró un 22-25% de aparición de anticuerpos anti-PEG en donantes de sangre sanos. Este desarrollo de anticuerpos anti-PEG, que puede limitar la eficacia en algunos pacientes, es contrario a la suposición general de que el PEG no es inmunogénico. Por lo tanto, los agentes terapéuticos PEGilados tienen implicaciones potenciales para el uso clínico, especialmente en un contexto de enfermedad inmuno comprometida. Además, se informó que la PEGilación de la molécula de Fab' disminuyó su actividad en 4 a 5 veces (Documento US2010/0104573) Xie et al., describen la necesidad de formatear Fc, que incluye hacer que la molécula sea bivalente, para mejorar la potencia (Xie et al., 2014 J. Immunol., 192: 4083-4092).

Por consiguiente, existe una necesidad de medicamentos anti-CD40L seguros y eficaces.

Los autores de la presente invención hipotetizaron que una entidad monovalente dirigida a CD40L sin un dominio Fc funcional puede representar una modalidad que inhibiría la coestimulación de células T CD40-CD40L sin inducir eventos adversos a través de la agregación y/o activación plaquetaria.

#### Resumen de la invención

La presente invención se propone proporcionar polipéptidos contra CD40L con propiedades profilácticas, terapéuticas y/o farmacológicas mejoradas, además de otras propiedades ventajosas (tales como, por ejemplo, facilidad de preparación mejorada, buena estabilidad y/o costos reducidos de los productos), en comparación con las secuencias de aminoácidos y anticuerpos de la técnica anterior.

Con base en el cribado, la caracterización y estrategias combinatorias no convencionales, los presentes inventores observaron inesperadamente que los dominios variables individuales de inmunoglobulina (ISVD) sustituidos se realizaron excepcionalmente en estudios de eficacia *in vivo* y experimentos de seguridad *in vitro*.

Además, los presentes inventores pudieron rediseñar los ISVD para que no solo superaran al estándar de referencia CDP7657 sino también para conservar este rendimiento tras la extensión de la semivida. Por otro lado, también se demostró que los ISVD de la invención son significativamente más seguros que los anticuerpos de la técnica anterior.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos que están dirigidos contra/y/o que pueden unirse específicamente (como se define en este documento) a CD40L.

En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que se une específicamente a CD40L, en donde la unión a CD40L modula una actividad de CD40L.

La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, donde dicho ISVD que se une específicamente a CD40L consiste esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en las cuales  
(i) CDR1 se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 33, 61, 40 y 68; y  
secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 33, 40 61 o 68;

(ii) CDR2 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 35, 63, 42 y 70; y secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 35, 42, 63 o 70; y

5 (iii) CDR3 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 37, 65, 44 y 72; y secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 37, 65, 44 o 72.

La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR1 se elige del grupo que consiste en

10

(a) SEQ ID NO: 61 y

(b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 61, en la que

15

- en la posición 1, la G ha sido cambiada por E o R;
- en la posición 2, la R ha sido cambiada por H o G;
- en la posición 3, la T ha sido cambiada por I, A, S o P;
- en la posición 4, la P ha sido cambiada por S;
- en la posición 5, la L ha sido cambiada por P;
- en la posición 6, la N ha sido cambiada por S, D o I;
- 20 - en la posición 7, la Y ha sido cambiada por H;
- en la posición 8, la H ha sido cambiada por N;
- en la posición 9, la M ha sido cambiada por K, T o V; y/o
- en la posición 10, la A ha sido cambiada por G, S o T.

25

La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR2 se elige del grupo que consiste en

(a) SEQ ID NO: 63; y

30

(b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 63, en la que

35

- en la posición 1, la A ha sido cambiada por G;
- en la posición 2, la I ha sido cambiada por V;
- en la posición 4, la S ha sido cambiada por N, R o G;
- en la posición 6, la L ha sido cambiada por I;
- en la posición 7, la G ha sido cambiada por S o D;
- en la posición 8, la S ha sido cambiada por G, I o F; y/o
- en la posición 9, la T ha sido cambiada por P o S.

40

La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR3 se elige del grupo que consiste en

(a) SEQ ID NO: 65; y

45

(b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 65, en la que

50

- en la posición 1, el R ha sido cambiada por Q o L;
- en la posición 2, la E ha sido cambiada por D o K;
- en la posición 3, la T ha sido cambiada por S, M, A o K;
- en la posición 4, la T ha sido cambiada por I, S, A o R;
- en la posición 5, la H ha sido cambiada por Y o N;
- en la posición 6, la Y ha sido cambiada por I, H o N;
- en la posición 7, la S ha sido cambiada por T, G, N o I;
- en la posición 8, la T ha sido cambiada por I o A;
- en la posición 9, la S ha sido cambiada por N o R;
- en la posición 10, la D ha sido cambiada por A;

- en la posición 11, la R ha sido cambiada por S o G;
  - en la posición 13, la N ha sido cambiada por D, Y o S;
  - en la posición 14, la E ha sido cambiada por V, A, D o N;
  - en la posición 15, la M ha sido cambiada por I, V, K o T;
  - 5 - en la posición 16, la R ha sido cambiada por K, S, W, M, G o T;
  - en la posición 17, la H ha sido cambiada por N, L, Q, R o D;
  - en la posición 19, la D ha sido cambiada por N; y/o
  - en la posición 20, la Y ha sido cambiada por H, F o N.
- La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en este documento, en el que
- 10 - CDR1 es la SEQ ID NO: 33, CDR2 es la SEQ ID NO: 35 y CDR3 es la SEQ ID NO: 37; o
- CDR1 es la SEQ ID NO: 61, CDR2 es la SEQ ID NO: 63 y CDR3 es la SEQ ID NO: 65.
- La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho ISVD es la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 6.
- 15 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR1 se elige del grupo que consiste en
- 20 (a) SEQ ID NO: 40; y
- (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 40, en la que
- en la posición 3, la T ha sido cambiada por S, N, A o I;
  - en la posición 4, la L ha sido cambiada por Q, S, M o G;
  - 25 - en la posición 8, la A ha sido cambiada por N o V;
  - en la posición 9 la I ha sido cambiada por L o V; y/o
  - en la posición 10, la G ha sido cambiada por A.
- La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, 8, en el que CDR2 se elige del grupo que consiste en
- 30 (a) SEQ ID NO: 42; y
- (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 42, en la que
- 35 - en la posición 2, la I ha sido cambiada por V;
- en la posición 3, la S ha sido cambiada por G;
  - en la posición 5, la E ha sido cambiada por G;
  - en la posición 6, la G ha sido cambiada por S;
  - en la posición 7, la S ha sido cambiada por G, N, T o I;
  - 40 - en la posición 8, la T ha sido cambiada por A, P, I o S; y/o
  - en la posición 9, la S ha sido cambiada por I, R o G.
- La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR3 se elige del grupo que consiste en
- 45 (a) SEQ ID NO: 44; y
- (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 44, en la que
- en la posición 4, la R ha sido cambiada por S;
  - 50 - en la posición 7, la L ha sido cambiada por F, M o W;
  - en la posición 8, la G ha sido cambiado por D, A o S;
  - en la posición 9, la S ha sido cambiado por G, N o R;
  - en la posición 10, la S ha sido cambiado por G, N, T o R;
  - en la posición 12, la D ha sido cambiada por G, N, E o V;

- en la posición 13, la T ha sido cambiada por N o A;
  - en la posición 14, la Q ha sido cambiada por H, K, L o R;
  - en la posición 15, la S ha sido cambiada por P o T;
  - en la posición 16, la H ha sido cambiada por N o Y;
  - 5 - en la posición 17, la Q ha sido cambiada por L, R o H;
  - en la posición 18, la Y ha sido cambiada por F;
  - en la posición 19, la D ha sido cambiada por G; y/o
  - en la posición 20, la Y ha sido cambiada por F o N.
- 10 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR1 es la SEQ ID NO: 40, CDR2 es la SEQ ID NO: 42 y CDR3 es la SEQ ID NO: 44.
- 15 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho ISVD es la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 3.
- 20 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe aquí, donde dicho polipéptido se une a CD40L con una KD entre  $1E^{-07}$  M y  $1E^{-13}$  M, tal como entre  $1E^{-08}$  M y  $1E^{-12}$  M, preferiblemente como máximo  $1E^{-07}$  M, preferiblemente menor que  $1E^{-08}$  M o  $1E^{-09}$  M, o incluso menor que  $1E^{-10}$  M, como  $5E^{-11}$  M,  $4E^{-11}$  M,  $3E^{-11}$  M,  $2E^{-11}$  M,  $1,7E^{-11}$  M,  $1E^{-11}$ , o incluso  $5E^{-12}$  M,  $4E^{-12}$  M,  $3E^{-12}$  M,  $1E^{-12}$  M, por ejemplo como se determina por un KinExA.
- 25 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido se une a CD40L con una  $IC_{50}$  entre  $1E^{-07}$  M y  $1E^{-12}$  M, tal como entre  $1E^{-08}$  M y  $1E^{-11}$  M, por ejemplo, según lo determinado por un ensayo de proliferación de células B o como se determina mediante un ensayo de señalización de células B.
- 30 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, donde dicho polipéptido se une a CD40L con una  $IC_{50}$  de a lo sumo  $1E^{-07}$  M, preferiblemente  $1E^{-08}$  M,  $1E^{-09}$  M o  $5E^{-10}$  M,  $4E^{-10}$  M,  $3E^{-10}$  M,  $2E^{-10}$  M, tal como  $1E^{-10}$  M.
- 35 La presente invención también se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido se une a CD40L con una constante de disociación inferior a  $5E^{-04}$  (s<sup>-1</sup>), por ejemplo, como se determina por SPR.
- 40 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho CD40L es preferiblemente CD40L humana, preferiblemente la SEQ ID NO: 18.
- 45 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido bloquea la unión de CD40L a CD40 en al menos un 20%, tal como al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o incluso más, por ejemplo, como se determina mediante competición por el ligando, ensayo de activación de células B, AlphaScreen o ensayos de unión competitiva, tales como ELISA de competición o FACS de competición.
- 50 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido antagoniza la inducción mediada por CD40 de moléculas coestimuladoras de células T, tales como CD80 y CD86 y/o moléculas inmunoestimuladoras tales como IL-12.

La presente invención también se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido inhibe la activación de células B.

5 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido no induce sustancialmente fosforilación de JNK en células T Jurkat o no induce sustancialmente secreción de IFN $\gamma$  por células T Jurkat coestimuladas con anticuerpo anti CD3.

10 La presente invención también se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido inhibe la activación de células B, por ejemplo, como se determina mediante un ensayo IgG de TT.

15 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, que comprende además una albúmina de suero que se une a ISVD (nanoanticuerpo ALB).

20 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en la que dicha albúmina sérica de unión a ISVD consiste esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en las que CDR1 es la SEQ ID NO. : 74, CDR2 es la SEQ ID NO: 75, CDR1 es la SEQ ID NO: 76.

25 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicha albúmina de suero que se une a ISVD se elige del grupo que consiste en ALB135 (SEQ ID NO: 15), ALB129 (SEQ ID NO: 13), ALB8 (SEQ ID NO: 11), ALB23 (SEQ ID NO: 12) y ALB132 (SEQ ID NO: 14).

30 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho ISVD que se une específicamente a CD40L y dicha albúmina de suero que se une a ISVD están directamente unidos entre sí o están unidos a través de un enlazador.

35 La presente invención también se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho enlazador se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18-29 y 77, preferiblemente la SEQ ID NO: 21.

40 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en este documento, que comprende además una extensión del C-terminal.

45 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicha extensión del C-terminal es una extensión del extremo terminal C (X) $n$ , en la que  $n$  es 1 a 10, preferiblemente 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I)

50 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido comprende además una albúmina de suero que se une a ISVD como se describe en la presente memoria, un enlazador como se describe en este documento, y una extensión del C-terminal terminal como se describe en la presente memoria.

La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, donde dicho polipéptido tiene al menos 80%, 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia con C010003318 (SEQ ID NO: 9) o C010003313 (SEQ ID NO: 78).

5 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido no induce sustancialmente activación de células endoteliales primarias.

10 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido no induce sustancialmente activación plaquetaria o agregación plaquetaria, por ejemplo, como se determina mediante un ensayo de activación plaquetaria o un ensayo de agregación plaquetaria.

15 La presente invención también se refiere a un método para tratar la prevención de enfermedades o trastornos en un individuo, por ejemplo, en el que está implicada la activación inapropiada de una ruta mediada por CD40L/CD40, comprendiendo el método administrar el polipéptido de la invención a dicho individuo en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de dicha enfermedad o trastorno.

20 La presente invención también se refiere a un método como se describe en la presente memoria, en el que dichas enfermedades o trastornos comprenden lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis lúpica, púrpura trombocitopénica inmune (ITP), rechazo de trasplantes, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) , colitis, asma/alergia, aterosclerosis, miastenia grave, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad coronaria, diabetes tipo 1 y  
25 respuesta inmune a productos farmacológicos recombinantes, por ejemplo, factor VII en la hemofilia.

30 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en este documento para uso como medicamento.

La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en este documento para uso en el tratamiento o prevención de un síntoma de una enfermedad autoinmune, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis lúpica, púrpura trombocitopénica  
35 inmune (ITP), rechazo de trasplantes, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), colitis, asma/alergia, aterosclerosis, miastenia grave, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad coronaria, diabetes tipo 1 y respuesta inmune a productos farmacológicos recombinantes, por ejemplo, factor VII en la hemofilia.

40 La presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido bloquea en forma cruzada la unión a CD40L de al menos uno de los polipéptidos 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3) C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: 9) y/o se bloquea en forma cruzada para unirse  
45 a CD40L por al menos uno de los polipéptidos 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3), C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: 9).

La presente invención también se refiere a un polipéptido que bloquea en forma cruzada la unión a CD40L mediante al menos uno de 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3)  
50 C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: : 9) y/o se bloquea en forma cruzada para unirse a CD40L mediante al menos uno de 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3), C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: 9), en el que dicho polipéptido comprende al menos un VH, VL, dAb, dominio variable único de

inmunoglobulina (ISVD) que se une específicamente a CD40L, en donde la unión a CD40L modula una actividad de CD40L.

#### 4. Leyendas de las Figuras

Figura 1: Gráfico que muestra los puntos de datos obtenidos en el Ejemplo 6.9.3 cuando se analizaron 96 muestras de suero para unir un nanocuerpo representativo con una mutación S112K (Referencia A + S112K + alanina del C-terminal, indicada como (2) en la Figura 1), comparado con un nanocuerpo de referencia sin una mutación S112K (Referencia A, SEQ ID NO: 16, indicada como (1) en la Figura 1).

Figura 2: Gráfico que muestra los puntos de datos obtenidos en el Ejemplo 6.9.3 cuando se analizaron 129 muestras de suero para unir un nanocuerpo representativo con una mutación V89T (Referencia A + L11V + V89T + alanina del C-terminal, indicada como (2) en la Figura 2), comparado con un nanocuerpo de referencia sin una mutación V89T (Referencia A, SEQ ID NO: 16, indicada como (1) en la Figura 2).

Figura 3: Datos de activación plaquetaria por HV

Figura 4: Datos de activación plaquetaria por SLE

Figura 5: Datos de agregación plaquetaria por HV

Figura 6: Datos de agregación plaquetaria por SLE

Figura 7: nanoanticuerpos anti-CD40L que perjudican la respuesta de IgG de TT

Figura 8: Inducción de IL-6 tras la estimulación de PBMC humanas con los diferentes compuestos a las concentraciones indicadas.

#### 5. Descripción detallada

Sigue existiendo la necesidad de medicamentos anti-CD40L seguros y eficaces. Estos medicamentos deben cumplir con diversos requisitos y con frecuencia opuestos. El formato debe ser ampliamente aplicable. En particular, el formato debería ser preferiblemente útil en una amplia gama de pacientes y preferiblemente también frente a una amplia gama de trastornos mediados por CD40L. El formato debe ser preferiblemente seguro y no inducir ningún evento tromboembólico. Además, el formato debe ser preferiblemente amigable para el paciente. Por ejemplo, el formato debe tener una semivida extendida, de modo que el formato no se elimine instantáneamente tras la administración por eliminación renal. Sin embargo, la prolongación de la semivida preferiblemente no debería introducir una actividad fuera del objetivo y efectos secundarios, inducir TE o limitar la eficacia.

La presente invención realiza al menos uno de estos requisitos.

Basándose en cribado, caracterización y estrategias combinatorias no convencionales, los presentes inventores observaron sorprendentemente que los dominios variables individuales de inmunoglobulina (ISVD) presentes se comportaron excepcionalmente en estudios de eficacia *in vivo* y experimentos de seguridad *in vitro*.

Además, los presentes inventores pudieron rediseñar los ISVD para que no solo superaran al estándar de referencia CDP7657 sino también para conservar este rendimiento tras la extensión de la semivida. Por otro lado, también se demostró que los ISVD de la invención son significativamente más seguros que los anticuerpos de la técnica anterior.

La presente invención proporciona polipéptidos que antagonizan CD40L con propiedades profilácticas, terapéuticas y/o farmacológicas mejoradas, que incluyen un perfil más seguro, en comparación con las secuencias de aminoácidos y anticuerpos de la técnica anterior.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos que se dirigen contra y/o que pueden unirse específicamente (como se define en este documento) a CD40L y modular la actividad de los mismos, en particular un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que se une específicamente a CD40L, en donde la unión a CD40L modula una actividad de CD40L.

A menos que se indique o se defina lo contrario, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, lo cual será claro para el experto en la materia. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, tales como Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2da. edición) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), F. Ausubel et al., (Current protocols in molecular biology, Green Publishing y Wiley Interscience, Nueva York, 1987), Lewin (Genes II, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1985), Old et al., (Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2da edición) University of California Press, Berkeley, CA, 1981); Roitt et al., (Immunology (sexta edición) Mosby/Elsevier, Edimburgo, 2001), Roitt et al., (Roitt's Essential Immunology (10ª edición) Blackwell Publishing, Reino Unido, 2001), y Janeway et al., (Immunobiology (6ª edición) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York, 2005), así como a los antecedentes generales citados en estos documentos.

A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera ya conocida, como quedará claro para la persona experta. Se hace referencia, por ejemplo, nuevamente a los manuales estándar y al estado general de la técnica mencionado en este documento y a las referencias adicionales citadas en el mismo; así como a, por ejemplo, las siguientes revisiones Presta (Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6): 640-56, 2006), Levin y Weiss (Mol. Biosyst. 2 (1): 49-57, 2006), Irving et al., (J. Immunol. Methods 248 (1-2): 31 - 45, 2001), Schmitz et al. (Placenta 21 Suppl. A: S106-12, 2000), Gonzales et al., (Tumor Biol. 26 (1): 31-43, 2005), que describen técnicas para la ingeniería de proteínas, tales como la maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.

Debe observarse que tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la", incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la materia que podrían ser modificados o sustituidos por los métodos descritos en este documento.

A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Tales equivalentes están destinados a ser abarcados por la presente invención.

El término "y/o" siempre que se use aquí incluye el significado de "y", "o" y "todas y cada una de otras combinaciones de los elementos conectados por dicho término".

El término "aproximadamente" o "alrededor de" como se usa en la presente memoria significa dentro del 20%, preferiblemente dentro del 15%, más preferiblemente dentro del 10%, y lo más preferiblemente dentro del 5% de un valor o intervalo dado.

- 5 A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se usa aquí, el término "que comprende" puede sustituirse con el término "que contiene" o "que incluye" o, a veces, cuando se usa en la presente memoria con el término "que tiene".

- 15 El término "secuencia" como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos de "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia de VHH" o "secuencia de proteína") debe entenderse generalmente que incluye tanto el secuencia relevante de aminoácidos, así como de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

- 20 Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el código estándar de aminoácidos de tres letras o una letra. Se hace referencia a la Tabla A-2 en la página 48 del documento WO 08/020079.

- 25 Un ácido nucleico o aminoácido se considera que está "(en) (forma) (esencialmente) aislada", por ejemplo, en comparación con el medio de reacción o medio de cultivo del que se ha obtenido, cuando se ha separado de al menos otro componente con el que normalmente se asocia en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente minoritario. En particular, un ácido nucleico o aminoácido se considera "(esencialmente) aislado" cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Un ácido nucleico o aminoácido que está "en forma (esencialmente) aislada" es preferiblemente esencialmente homogéneo, como se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida.

- 40 Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos "comprende" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o que "consiste esencialmente en" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, esto puede significar que la última secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos se ha incorporado en la primera secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos mencionada, respectivamente, pero más usualmente esto significa generalmente que la primera secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos mencionada comprende dentro de su secuencia un tramo de nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que la última secuencia, independientemente de cómo se haya generado u obtenido realmente la primera secuencia mencionada (que puede ser, por ejemplo, mediante cualquier método adecuado descrito en este documento). Por medio de un ejemplo no limitante, cuando se dice que un polipéptido de la invención comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, esto puede significar que dicha secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina se ha incorporado en la secuencia del polipéptido de la invención, pero más usualmente esto generalmente significa que el polipéptido de la invención contiene dentro de su secuencia la secuencia de los dominios variables individuales de inmunoglobulina independientemente de cómo se haya generado u obtenido

- dicho polipéptido de la invención. Además, cuando se dice que una secuencia de ácido nucleico o nucleótido comprende otra secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de ácido nucleico o nucleótido mencionada es preferiblemente tal que, cuando se expresa en un producto de expresión (por ejemplo, un polipéptido), la secuencia de aminoácidos codificada por la última secuencia de nucleótidos forma parte de dicho producto de expresión (en otras palabras, que la última secuencia de nucleótidos está en el mismo marco de lectura que la primera secuencia mencionada de ácidos nucleicos o nucleótidos más grande).
- 10 Por "esencialmente consiste en" se entiende que el dominio variable único de inmunoglobulina usado en el método de la invención es exactamente el mismo que el polipéptido de la invención o corresponde al polipéptido de la invención que tiene un número limitado de residuos de aminoácidos, tal como 1-20 residuos de aminoácidos, por ejemplo 1-10 residuos de aminoácidos y preferiblemente 1-6 residuos de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos, añadidos en el extremo terminal amino, en el extremo terminal carboxilo, o tanto en el extremo terminal amino como en el extremo terminal carboxilo del dominio variable único de inmunoglobulina.
- 20 Con el fin de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos puede calcularse dividiendo [el número de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos] por [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos] y multiplicando por [100%], en el que cada eliminación, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos, comparado con la primera secuencia de nucleótidos se considera como una diferencia en un solo nucleótido (posición). Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos puede calcularse usando un algoritmo informático conocido para la alineación de secuencias tal como NCBI Blast v2.0, usando configuraciones estándar.
- 30 Algunas otras técnicas, algoritmos informáticos y configuraciones para determinar el grado de identidad de secuencia se describen, por ejemplo, en los documentos WO 04/037999, EP 0967284, EP 1085089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 y GB 2357768. Usualmente, con el fin de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias de nucleótidos de acuerdo con el método de cálculo descrito anteriormente, la secuencia de nucleótidos con el mayor número de nucleótidos se tomará como la "primera" secuencia de nucleótidos, y el otra la secuencia de nucleótidos se tomará como la "segunda" secuencia de nucleótidos.
- 40 Con el fin de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos (también denominada aquí como "identidad de aminoácidos") se puede calcular dividiendo [el número de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos] por [el número total de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicando por [100%], en el que cada eliminación, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la primera secuencia de aminoácidos, se considera como una diferencia en un único residuo de aminoácido (posición), es decir, como una "diferencia de aminoácidos" como se define en este documento. Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede calcularse usando un algoritmo informático conocido, tal como los mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad de secuencia para secuencias de nucleótidos, utilizando nuevamente configuraciones estándar. Usualmente, con el fin de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias de

aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo descrito anteriormente, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos de aminoácidos se tomará como la "primera" secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la "segunda" secuencia de aminoácidos.

5

Además, para determinar el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, el experto puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", que generalmente se pueden describir como sustituciones de aminoácidos en las que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones conservadoras de aminoácidos son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, a partir de los documentos WO 04/037999, GB 335768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y los tipos (preferidos) y/o combinaciones de tales sustituciones se pueden seleccionar con base en las enseñanzas pertinentes del documento WO 04/037999 así como del documento WO 98/49185 y de las referencias adicionales citadas en los mismos.

10

15

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

20

25

30

Cualquier sustitución de aminoácidos aplicada a los polipéptidos descritos en la presente memoria también puede basarse en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrolladas por Schulz et al., ("Principles of Protein Structure", Springer-Verlag, 1978), en los análisis de potenciales de formación de estructuras desarrollados por Chou y Fasman (Biochemistry 13: 211, 1974, Adv Enzymol., 47: 45-149, 1978), y en el análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrolladas por Eisenberg et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984), Kyte y Doolittle (J. Molec. Biol. 157: 105- 132, 1981), y Goldman et al., (Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986), todas incorporadas aquí en su totalidad como referencia. La información de la estructura primaria, secundaria y terciaria de los nanoanticuerpos se proporciona en la descripción de este documento y en el estado general de la técnica citado anteriormente. Además, para este propósito, la estructura cristalina de un dominio  $V_{HH}$  de una llama la suministra por ejemplo Desmyter et al., (Nature Structural Biology, 3: 803, 1996), Spinelli et al., (Natural Structural Biology, 3: 752-757, 1996) y Decanniere et al., (Structure, 7 (4): 361, 1999). Se puede encontrar información adicional acerca de algunos de los residuos de aminoácidos que en dominios  $V_H$  convencionales forman la interfaz  $V_H/V_L$  y posibles sustituciones camelizantes en estas posiciones en el estado de la técnica citado anteriormente.

35

40

45

50

Se dice que las secuencias de aminoácidos y las secuencias de ácidos nucleicos son "exactamente iguales" si tienen una identidad de secuencia del 100% (como se define en este documento) en toda su longitud.

En una realización, el polipéptido de la invención que se une específicamente a CD40L tiene al menos 80%, 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia con C010003318 (SEQ ID NO: 9) o C010003313 (SEQ ID NO: 78), en donde la unión a CD40L modula una actividad de CD40L.

5

Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término "diferencia de aminoácidos" se refiere a una inserción, eliminación o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia, en comparación con la segunda secuencia; entendiéndose que las dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o más de tales diferencias de aminoácidos. Más particularmente, en las secuencias de aminoácidos y/o polipéptidos de la presente invención, el término "diferencia de aminoácidos" se refiere a una inserción, eliminación o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición de una secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3; entendiéndose que la secuencia de CDR1 puede contener 1, 2 o máximo 3 de tales diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR1 original, por ejemplo, la secuencia CDR1 ejemplificada por un identificador de secuencia específico (SEQ ID NO), tal como, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 33, 61, 40 y 68; la CDR2 puede contener 1, 2 o máximo 3 de tales diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia original de CDR2, por ejemplo, la secuencia CDR2 ejemplificada por un identificador de secuencia específico (SEQ ID NO:), tal como por ejemplo, las SEQ ID NOs: 35, 63, 42 y 70, y la secuencia CDR3 puede contener 1, 2, 3 o máximo 4 de tales diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR3 original, por ejemplo la secuencia de CDR3 ejemplificada por un identificador de secuencia específico (SEQ ID NO:), tal como, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 37, 65, 44 y 72.

25

La "diferencia de aminoácidos" puede ser cualquiera de una, dos, tres o cuatro sustituciones, eliminaciones o inserciones máximas, o cualquier combinación de las mismas, que mejoren las propiedades del ISVD de la invención o que al menos no se aparten demasiado de las propiedades deseadas o del equilibrio o combinación de las propiedades deseadas de los ISVD de la invención. A este respecto, el polipéptido resultante de la invención debe unir al menos CD40L con la misma, aproximadamente la misma, o preferiblemente una afinidad o potencia mayor en comparación con el polipéptido que comprende el CD40L de unión a ISVD que comprende una o más secuencias CDR sin las uno, dos, tres o máximo cuatro sustituciones, eliminaciones o inserciones. La afinidad se puede medir, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), por ejemplo, tal como se expresa mediante la constante de disociación  $K_{\text{disociación}}$  tal como se usa en los ejemplos. La potencia, por ejemplo, como se expresa mediante  $IC_{50}$ , se puede medir mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, en ensayos de proliferación de células B o ensayos de señalización de células B como se usa en los ejemplos.

40

A este respecto, la secuencia de aminoácidos de las CDR puede ser una secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de aminoácidos de CDR original mediante maduración por afinidad utilizando una o más técnicas de maduración por afinidad ya conocidas, por ejemplo, mediante PCR propensa a errores, como se usa en la sección de ejemplos. Se demostró en la sección de ejemplos que la afinidad y/o potencia de los ISVD de la invención se mejoraron, por ejemplo, las diferencias de un único aminoácido en las CDR dieron como resultado constantes de disociación de 1,8 veces a 5,2 veces mejores. Combinaciones de diferencias de aminoácidos, por ejemplo, una, dos, tres o máximo cuatro sustituciones, eliminaciones o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, en las CDR mejoraron aún más las constantes de disociación.

50

Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos como se describe en el presente documento, en el que dicho polipéptido se une a CD40L con una  $K_{\text{disociación}}$  mejor

que 28B02 y 46B03, respectivamente, tal como al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o incluso más, tal como 10 veces mejor, por ejemplo, según lo determinado por SPR.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos como se describe en la presente memoria, donde dicho polipéptido se une a CD40L con un  $K_{\text{disociación}}$  de como máximo  $5E^{-04} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ , como máximo  $4E^{-04} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $3E^{-04} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $2E^{-04} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $1E^{-04} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $9E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $8E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $7E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $6E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $5E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $4E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $3E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $2E^{-05} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ,  $10E^{-06} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ , por ejemplo como se determina por SPR.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos como se describe en la presente memoria, en la que dicho polipéptido se une a CD40L con una  $IC_{50}$  entre  $1E^{-07} \text{ M}$  y  $1E^{-12} \text{ M}$ , tal como entre  $1E^{-08} \text{ M}$  y  $1E^{-11} \text{ M}$ , preferiblemente como máximo  $1E^{-07} \text{ M}$ , preferiblemente menor que  $1E^{-08} \text{ M}$  o  $1E^{-09} \text{ M}$ , o incluso menor que  $5E^{-10} \text{ M}$ ,  $4E^{-10} \text{ M}$ ,  $3E^{-10} \text{ M}$ ,  $2E^{-10} \text{ M}$ , tal como  $1E^{-10} \text{ M}$ , por ejemplo como se determina mediante un ensayo de proliferación de células B o un ensayo de señalización de células B.

Por ejemplo, y dependiendo del organismo huésped usado para expresar el polipéptido de la invención, tales inserciones, eliminaciones y/o sustituciones pueden diseñarse de tal manera que uno o más sitios para la modificación postraducciona (tal como uno o más sitios de glicosilación) se eliminan, como lo conoce una persona experta en la técnica.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, donde dicho ISVD que se une específicamente a CD40L consiste esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en las cuales

(i) CDR1 se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 33, 61, 40 y 68; y secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 33, 61, 40 o 68;

(ii) CDR2 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 35, 63, 42 y 70; y secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 35, 63, 42 o 70; y

(iii) CDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 65, 44 y 72; y secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NOs: 37, 65, 44 o 72.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR1 se elige del grupo que consiste en (a) SEQ ID NO: 40; y (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 40, en la que

- en la posición 3, la T ha sido cambiada por S, N, A o I;
- en la posición 4, la L ha sido cambiada por Q, S, M o G;
- en la posición 8, la A ha sido cambiada por N o V;
- en la posición 9, la I ha sido cambiada por L o V; y/o
- en la posición 10, la G ha sido cambiada por A.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR2 se elige del grupo que consiste en (a) SEQ ID NO: 42; y (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 42, en la que

- en la posición 2, la I ha sido cambiada por V;
- en la posición 3, la S ha sido cambiada por G;
- en la posición 5, la E ha sido cambiada por G;

- en la posición 6, la G ha sido cambiada por S;
- en la posición 7, la S ha sido cambiada por G, N, T o I;
- en la posición 8, la T ha sido cambiada por A, P, I o S; y/o
- en la posición 9, la S ha sido cambiada por I, R o G.

5

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR3 se elige del grupo que consiste en (a) SEQ ID NO: 44; y (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 44, en la que

10

- en la posición 4, la R ha sido cambiada por S;
- en la posición 7, la L ha sido cambiada por F, M o W;
- en la posición 8, la G ha sido cambiada por D, A o S;
- en la posición 9, la S ha sido cambiada por G, N o R;
- en la posición 10, la S ha sido cambiada por G, N, T o R;
- 15 - en la posición 12, la D ha sido cambiada por G, N, E o V;
- en la posición 13, la T ha sido cambiada por N o A;
- en la posición 14, la Q ha sido cambiada por H, K, L o R;
- en la posición 15, la S ha sido cambiada por P o T;
- en la posición 16, la H ha sido cambiada por N o Y;
- 20 - en la posición 17, la Q ha sido cambiada por L, R o H;
- en la posición 18, la Y ha sido cambiada por F;
- en la posición 19, la D ha sido cambiada por G; y/o
- en la posición 20, la Y ha sido cambiada por F o N.

25

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR1 se elige entre el grupo que consiste en (a) SEQ ID NO: 61; y (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 61, en la que

30

- en la posición 1, la G ha sido cambiada por E o R;
- en la posición 2, la R ha sido cambiada por H o G;
- en la posición 3, la T ha sido cambiada por I, A, S o P;
- en la posición 4, la P ha sido cambiada por S;
- en la posición 5, la L ha sido cambiada por P;
- en la posición 6, la N ha sido cambiada por S, D o I;
- 35 - en la posición 7, la Y ha sido cambiada por H;
- en la posición 8, la H ha sido cambiada por N;
- en la posición 9, la M ha sido cambiada por K, T o V; y/o
- en la posición 10, la A ha sido cambiada por G, S o T.

40

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR2 se elige del grupo que consiste en (a) SEQ ID NO: 63; y (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 63, en el que

45

- en la posición 1, la A ha sido cambiada por G;
- en la posición 2, la I ha sido cambiada por V;
- en la posición 4, la S ha sido cambiada por N, R o G;
- en la posición 6, la L ha sido cambiada por I;
- en la posición 7, la G ha sido cambiada por S o D;
- en la posición 8, la S ha sido cambiada por G, I o F; y/o
- 50 - en la posición 9, la T ha sido cambiada por P o S.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR3 se elige del grupo que consiste en (a) la SEQ ID NO: 65;

y (b) secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 65, en la que

- en la posición 1, la R ha sido cambiada por Q o L;
- en la posición 2, la E ha sido cambiada por D o K;
- 5 - en la posición 3, la T ha sido cambiada por S, M, A o K;
- en la posición 4, la T ha sido cambiada por I, S, A o R;
- en la posición 5, la H ha sido cambiada por Y o N;
- en la posición 6, la Y ha sido cambiada por I, H o N;
- en la posición 7, la S ha sido cambiada por T, G, N o I;
- 10 - en la posición 8, la T ha sido cambiada por I o A;
- en la posición 9, la S ha sido cambiada por N o R;
- en la posición 10, la D ha sido cambiada por A;
- en la posición 11, la R ha sido cambiada por S o G;
- en la posición 13, la N ha sido cambiada por D, Y o S;
- 15 - en la posición 14, la E ha sido cambiada por V, A, D o N;
- en la posición 15, la M ha sido cambiada por I, V, K o T;
- en la posición 16, la R ha sido cambiada por K, S, W, M, G o T;
- en la posición 17, la H ha sido cambiada por N, L, Q, R o D;
- en la posición 19, la D ha sido cambiada por N; y/o
- 20 - en la posición 20, la Y ha sido cambiada por H, F o N.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en este documento, en el que

- CDR1 es la SEQ ID NO: 33, CDR2 es la SEQ ID NO: 35 y CDR3 es la SEQ ID NO: 37; o
- 25 - CDR1 es la SEQ ID NO: 61, CDR2 es la SEQ ID NO: 63 y CDR3 es la SEQ ID NO: 65.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho ISVD es la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 6.

- 30 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que CDR1 es la SEQ ID NO: 40, CDR2 es la SEQ ID NO: 42 y CDR3 es la SEQ ID NO: 44.

- 35 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho ISVD es la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 3.

- 40 Una "familia de nanoanticuerpos", "familia de VHH" o "familia" como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un grupo de nanoanticuerpos y/o secuencias de VHH que tienen longitudes idénticas (es decir, tienen el mismo número de aminoácidos dentro de su secuencia) y cuya secuencia de aminoácidos entre la posición 8 y la posición 106 (según la numeración Kabat) tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80%, tal como por ejemplo 85%, 90%, 95% o incluso más, por ejemplo 99%.

- 45 Los términos "epítipo" y "determinante antigénico", que pueden usarse indistintamente, se refieren a la parte de una macromolécula, tal como un polipéptido o proteína que es reconocida por moléculas de unión a antígeno, tales como inmunoglobulinas, anticuerpos convencionales, dominios variables de una sola inmunoglobulina, VHH, nanoanticuerpos y/o polipéptidos de la invención, y más particularmente por el sitio de unión a antígeno de dichas moléculas. Los epítopos definen el sitio de unión mínimo para una inmunoglobulina y, por lo
- 50 tanto, representan el objetivo de especificidad de una inmunoglobulina.

La parte de una molécula de unión a antígeno (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo convencional, un dominio variable único de inmunoglobulina y/o un polipéptido de la invención) que reconoce el epítipo se denomina "parátipo".

Un polipéptido (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable único de inmunoglobulina, un polipéptido de la invención, o generalmente una molécula de unión a antígeno o un fragmento del mismo) que puede "unirse a" o "unirse específicamente a", que "tiene afinidad por" y/o que "tiene especificidad por" un cierto epítipo, antígeno o proteína (o por al menos una parte, fragmento o epítipo de la misma) se dice que esta "contra" o "dirigido contra" dicho epítipo, antígeno o proteína o es una molécula de "unión" con respecto a dicho epítipo, antígeno o proteína, o se dice que es "anti" -epítipo, "anti" -antígeno o "anti" -proteína (por ejemplo, "anti" -CD40L).

La afinidad denota la fuerza o la estabilidad de una interacción molecular. La afinidad comúnmente se da por  $K_D$ , o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también se puede expresar como una constante de asociación,  $K_A$ , que equivale a  $1/K_D$  y tiene unidades de  $(\text{mol/litro})^{-1}$  (o  $\text{M}^{-1}$ ). En la presente especificación, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas se expresará principalmente en términos del valor  $K_D$  de su interacción; para el experto es evidente que, en vista de la relación  $K_A = 1/K_D$ , que especifica la intensidad de la interacción molecular por su valor de  $K_D$  también se puede usar para calcular el correspondiente valor de  $K_A$ . El valor de  $K_D$  caracteriza la fuerza de una interacción molecular también en un sentido termodinámico, ya que está relacionada con el cambio de energía libre (DG) de unión por la conocida relación  $DG = RT \cdot \ln(K_D)$  (equivalente a  $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$ ), donde R es igual a la constante del gas, T es igual a la temperatura absoluta y ln denota el logaritmo natural.

Las  $K_D$  para las interacciones biológicas que se consideran significativas (por ejemplo, específicas) están típicamente en el intervalo de  $10^{-10}$  M (0,1 nM) a  $10^{-5}$  M (10000 nM). Cuanto más fuerte es una interacción, menor es su  $K_D$ .

La  $K_D$  también se puede expresar como la relación de la constante de la velocidad de disociación de un complejo, denotada como  $k_{\text{disociación}}$ , con respecto a la velocidad de su asociación, denotada como  $k_{\text{asociación}}$  (de modo que  $K_D = k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$  y  $K_A = k_{\text{asociación}}/k_{\text{disociación}}$ ). La constante de la velocidad de disociación  $k_{\text{disociación}}$  tiene unidades  $\text{s}^{-1}$  (en donde s es la notación de la unidad SI para segundo). La constante de la velocidad de asociación  $k_{\text{asociación}}$  tiene unidades  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . La constante de la velocidad de asociación puede variar entre  $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  hasta aproximadamente  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , acercándose a la constante de velocidad de asociación de difusión limitada para interacciones bimoleculares. La constante de la velocidad de disociación está relacionada con la semivida de una interacción molecular dada por la relación  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{disociación}}$ . La constante de velocidad de disociación puede variar entre  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (complejo casi irreversible con una  $t_{1/2}$  de múltiples días) a  $1 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ).

La  $K_D$  medida puede corresponder a la  $K_D$  aparente si el proceso de medición de alguna manera influye en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo, por artefactos relacionados con el recubrimiento en el biosensor de una molécula. Además, se puede medir una  $K_D$  aparente si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la otra molécula. En tal situación, la afinidad medida puede observarse afectada por la aidez de la interacción por las dos moléculas.

Otro enfoque que se puede usar para evaluar la afinidad es el procedimiento ELISA de 2 etapas (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) de Friguet et al., (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985). Este método establece una medición de equilibrio de unión de fase de solución y evita posibles artefactos relacionados con la adsorción de una de las moléculas sobre un soporte tal como el plástico.

Sin embargo, la medición precisa de  $K_D$  puede ser bastante laboriosa y, como consecuencia, a menudo los valores de  $K_D$  aparentes se determinan para evaluar la fuerza de unión de dos moléculas. Cabe señalar que, siempre que todas las mediciones se realicen de forma coherente (por ejemplo, manteniendo las condiciones del ensayo sin cambios), las mediciones de  $K_D$  aparentes se pueden utilizar como una aproximación de la  $K_D$  verdadera y, por lo tanto, en el presente documento  $K_D$  y  $K_D$  aparente deberían tratarse con la misma importancia o relevancia.

Finalmente, debe notarse que en muchas situaciones el científico experimentado puede juzgar que es conveniente determinar la afinidad de unión relativa a alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la fuerza de unión entre las moléculas A y B, se puede por ejemplo usar una molécula C de referencia que se sabe que se une a B y que está adecuadamente marcada con un grupo fluoróforo o cromóforo u otra fracción química, tal como biotina para una fácil detección en un ELISA o FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) u otro formato (el fluoróforo para la detección de fluorescencia, el cromóforo para la detección de absorción de luz, la biotina para detección por ELISA mediada por estreptavidina). Típicamente, la molécula C de referencia se mantiene a una concentración fija y la concentración de A se varía para una concentración dada o cantidad de B. Como resultado, se obtiene un valor de  $IC_{50}$  correspondiente a la concentración de A en la que la señal medida para C en ausencia de A se reduce a la mitad. Siempre que se conozca  $K_{D\text{ ref}}$ , la  $K_D$  de la molécula de referencia, así como la concentración total  $C_{\text{ref}}$  de la molécula de referencia, la  $K_D$  aparente para la interacción de A-B se puede obtener de la siguiente fórmula:  $KD = IC_{50}/(1 + C_{\text{ref}}/K_{D\text{ ref}})$ . Obsérvese que si  $C_{\text{ref}} \ll K_{D\text{ ref}}$ ,  $K_D \approx IC_{50}$ . Siempre que la medición de la  $IC_{50}$  se realice de manera consistente (por ejemplo, manteniendo  $C_{\text{ref}}$  fija) para los aglutinantes que se comparan, la fuerza o estabilidad de una interacción molecular puede evaluar mediante la  $IC_{50}$  y esta medición se considera equivalente a  $K_D$  o a  $K_D$  aparente a lo largo de este texto.

La unión específica de una proteína de unión a antígeno, tal como un ISVD, a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada ya conocida, que incluye, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoanálisis (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos ya conocidas en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en este documento.

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse mediante diferentes técnicas ya conocidas, tal como la bien conocida técnica de biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) (véase, por ejemplo, Ober et al., 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559) en la que una molécula se inmoviliza en el chip biosensor y la otra molécula se pasa por encima de la molécula inmovilizada en condiciones de flujo produciendo mediciones de  $K_{\text{asociación}}$ ,  $K_{\text{disociación}}$  y, por lo tanto, valores de  $K_D$  (o  $K_A$ ). Esto puede realizarse, por ejemplo, utilizando los bien conocidos instrumentos Biacore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). El ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Drake et al., 2004, Analytical Biochemistry 328: 35-43) mide los eventos de unión en solución sin etiquetado de los compañeros de unión y se basa en la exclusión cinética de la disociación de un complejo.

Se demostró que los polipéptidos de la presente invención tienen afinidades sobresalientes. Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos como se describe en la presente memoria, donde dicho polipéptido se une a CD40L con una  $K_D$  entre  $1E^{-07}$  M y  $1E^{-13}$  M, tal como entre  $1E^{-08}$  M y  $1E^{-12}$  M, preferiblemente como máximo  $1E^{-07}$  M, preferiblemente menor que  $1E^{-08}$  M o  $1E^{-09}$  M, o incluso menor que  $1E^{-10}$  M, tal como  $5E^{-11}$  M,  $4E^{-11}$  M,  $3E^{-11}$  M,  $2E^{-11}$  M,  $1.7E^{-11}$  M,  $1E^{-11}$ , o incluso  $5E^{-12}$  M,  $4E^{-12}$  M,  $3E^{-12}$  M,  $1E^{-12}$  M, por ejemplo como se determina mediante un KinExA.

El sistema de inmunoensayo Gyrolab<sup>MR</sup> proporciona una plataforma para bioanálisis automático y el cambio rápido de muestras (Fraley et al., 2013, Bioanalysis 5: 1765-74).

- 5 También estará claro para la persona experta en la materia que la  $K_D$  medida puede corresponder a la  $K_D$  aparente si el proceso de medición influye de algún modo en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo, mediante artefactos relacionados con el recubrimiento en el biosensor de una molécula. Además, se puede medir una  $K_D$  aparente si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la  
10 otra molécula. En tal situación, la afinidad medida puede observarse afectada por la avidez de la interacción de las dos moléculas.

- El término "especificidad" tiene el significado que se le da en el párrafo n) en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079; y como se menciona en este documento se refiere al  
15 número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos a los que se puede unir una molécula de unión a antígeno particular o proteína de unión a antígeno (tal como un dominio variable único de inmunoglobulina y/o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno se puede determinar basándose en la afinidad y/o avidez, como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079  
20 (que se incorpora aquí como referencia), que también describe algunas técnicas preferidas para medir la unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un dominio variable único de inmunoglobulina y/o polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente.

- Típicamente, las proteínas de unión a antígeno (tales como los dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o polipéptidos de la invención) se unirán a su antígeno con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos, y preferiblemente  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos y más preferiblemente  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (es decir, con una constante de asociación ( $K_A$ ) de  $10^5$  a  $10^{12}$  litros/moles o más, y preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{12}$  litros/moles o más y más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{12}$  litros/moles). Cualquier valor  $K_D$  mayor que  $10^{-4}$  mol/litro (o cualquier valor  $K_A$  menor que  $10^4$  M<sup>-1</sup>) litros/mol se considera generalmente que indica unión no específica. Preferiblemente, un polipéptido monovalente de la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad menor que 500 nM, preferiblemente menor que 200 nM, más preferiblemente menor que 10 nM, tal como, por ejemplo, entre 10 y 5 nM o menos. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada ya conocida, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos ya conocidas en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente  
40 documento. Como será evidente para el experto, y como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079, la constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente. Los métodos para determinar la constante de disociación serán claros para la persona experta, y por ejemplo incluyen las técnicas mencionadas en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079.

- Se dice que un único dominio y/o polipéptido variable de inmunoglobulina es "específico para" un primer objetivo o antígeno, por ejemplo, un epítipo de CD40L, comparado con un segundo objetivo o antígeno cuando se une al primer antígeno con afinidad (como se describió anteriormente, y se expresa adecuadamente como un valor de  $K_D$ , valor de  $K_A$ , una constante de velocidad  $K_{\text{disociación}}$  y/o constante de velocidad  $K_{\text{asociación}}$ ) que es al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces, y preferiblemente al menos 1.000 veces, y hasta 10.000 veces o más, mejor que la afinidad con la que el dominio variable único de inmunoglobulina y/o polipéptido se une al segundo objetivo o antígeno, es decir, diferente del primer objetivo o antígeno, por ejemplo, diferente de dicho epítipo de CD40L. Por  
50

ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina y/o polipéptido se puede unir al primer objetivo o antígeno con un valor de  $K_D$  que es al menos 10 veces menor, tal como al menos 100 veces menor, y preferiblemente al menos 1.000 veces menor, tal como 10.000 veces menor o incluso menor que aquel, que el  $K_D$  con el que dicho dominio variable único de inmunoglobulina y/o polipéptido se une al segundo objetivo o antígeno. Preferiblemente, cuando un dominio variable único de inmunoglobulina y/o polipéptido es "específico para" un primer objetivo o antígeno comparado con un segundo objetivo o antígeno, se dirige contra (tal como se define en la presente memoria) dicho primer objetivo o antígeno, pero no se dirige contra dicho segundo objetivo o antígeno.

CD40L también se conoce como CD 154, gp39, proteína de activación relacionada con TNF (TRAP), antígeno 5c8 o T-BAM. Se puede encontrar información estructural relevante para CD40L humana, por ejemplo, en UniProt, número de acceso P29965. "CD40L humana" se refiere al CD40L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el polipéptido de la invención se une específicamente a CD40L de *homo sapiens*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina*, *Aotus tigratus*, *Callithrix jacchus*, *Cercocebus torquatus atys*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Felis catus*, y/o *Sus scrofa*, que también se han secuenciado, preferiblemente CD40L humana, preferiblemente la SEQ ID NO: 1.

Los términos "bloqueo (cruzado)", "bloqueado (en forma cruzada)" "que bloquea (en forma cruzada)", "unión competitiva", "compite (en forma cruzada)", "que compete (en forma cruzada)" y "competencia (cruzada)" se usan indistintamente en este documento para referirse a la capacidad de una inmunoglobulina, anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido u otro agente de unión para interferir con la unión de otras inmunoglobulinas, anticuerpos, dominios variables individuales de inmunoglobulina, polipéptidos o agentes de unión a un objetivo dado. El grado en que una inmunoglobulina, anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido u otro agente de unión es capaz de interferir con la unión de otro al objetivo y, por lo tanto, si puede decirse que bloquea en forma cruzada de acuerdo con la invención, se puede determinar usando ensayos de unión competitiva, tales como, por ejemplo, seleccionando ISVD purificados frente a ISVD presentados en fagos en un ELISA de competición como se describe en los ejemplos. Si una unión de ISVD a CD40L compete completamente con otra unión de ISVD a CD40L (por ejemplo, el ISVD purificado en el ELISA de competición), dichos ISVD pertenecen al mismo intervalo de epítomos. Si una unión de ISVD a CD40L no compete o solo compete parcialmente con otra unión de ISVD a CD40L (por ejemplo, el ISVD purificado en el ELISA de competición), dichos ISVD pertenecen a un diferente compartimiento de epítomo. Se identificaron 7 diferentes compartimientos de epítomos dentro del panel principal de ISVD que se unen a CD40L.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, tal como las SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 78, 79, 80, 81 u 82, donde dicho polipéptido compete con un polipéptido, por ejemplo, según lo determinado por ELISA de competición.

La presente invención se refiere a un método para determinar competidores, tales como polipéptidos, que compiten con un polipéptido como se describe en la presente memoria, tales como las SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 78, 79, 80, 81 o 82, donde el polipéptido como se describe en la presente memoria compete o bloquea en forma cruzada al polipéptido competidor por la unión a CD40L, tal como, por ejemplo, hCD40L (SEQ ID NO: 1), en donde la unión a CD40L del competidor se reduce en al menos 5%, tal como 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o incluso más, tal como 80%, 90% o incluso 100% (es decir, virtualmente indetectable en un ensayo dado) en presencia de un polipéptido de la invención, en comparación con la unión a CD40L del competidor en ausencia del polipéptido

de la invención. La competición y el bloqueo cruzado se pueden determinar por cualquier medio conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, ELISA de competición o ensayo FACS. En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido de la invención, en el que dicho polipéptido bloquea en forma cruzada la unión a CD40L de al menos uno de los polipéptidos 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3) C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: 9) y/o se bloquea en forma cruzada para unirse a CD40L por al menos uno de los polipéptidos 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3) C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: 9).

La presente invención también se refiere a competidores que compiten con un polipéptido como se describe en este documento, tal como las SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 78, 79, 80, 81 u 82, donde el competidor compite con o bloquea en forma cruzada al polipéptido como se describe en la presente memoria para unirse a CD40L, donde la unión a CD40L del polipéptido de la invención se reduce en al menos 5%, tal como 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o incluso más, tal como 80%, o incluso más tal como al menos 90% o incluso 100% (es decir, virtualmente indetectable en un ensayo dado) en presencia de dicho competidor, en comparación con la unión a CD40L por el polipéptido de la invención en ausencia de dicho competidor. En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que bloquea en forma cruzada la unión a CD40L por un polipéptido de la invención tal como uno de 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3) C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: 9) y/o se bloquea en forma cruzada para unirse a CD40L por al menos uno de 46B03 (SEQ ID NO: 6), 28B02 (SEQ ID NO: 3) C010003290 (SEQ ID NO: 8) y C010003318 (SEQ ID NO: 9), donde dicho polipéptido comprende al menos un VH, VL, dAb, dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que se une específicamente a CD40L, en donde la unión a CD40L modula una actividad de CD40L.

El ensayo FACS adecuado para determinar si una inmunoglobulina, anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido u otro agente de unión bloquea en forma cruzada o es capaz de bloqueo en forma cruzada de acuerdo con la invención, se describe a continuación. Se apreciará que el ensayo puede usarse con cualquiera de las inmunoglobulinas, anticuerpos, dominios variables individuales de inmunoglobulina, polipéptidos u otros agentes de unión descritos en este documento. El instrumento FACS (por ejemplo, FACS Canto; Becton Dickinson) se opera de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para evaluar el "bloqueo (en forma cruzada)" o "competencia (cruzada)" entre dos agentes de unión (tales como, por ejemplo, dos dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o nanoanticuerpos) para la unión a CD40L, se puede realizar un experimento de competición FACS usando células (tales como, por ejemplo, células CHO o células HEK293H) que sobreexpresan CD40L humana y las células parentales como línea celular de fondo. Se pueden usar diferentes reactivos de detección incluyendo, por ejemplo, anticuerpo monoclonal ANTI-FLAG® M2 (Sigma-Aldrich, catálogo # F1804), anticuerpo monoclonal anti-C-myc (Sigma-Aldrich, catálogo # WH0004609M2), anticuerpo monoclonal ANTI-etiqueta HIS (Sigma-Aldrich, catálogo # SAB1305538), cada uno etiquetado de manera diferente.

Se puede usar una amplia gama de fluoróforos como marcadores en citometría de flujo, conocidos por el experto. Los fluoróforos, o simplemente "fluoros", se unen típicamente al anticuerpo (por ejemplo, los dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o nanoanticuerpos) que reconoce CD40L o al anticuerpo que se usa como reactivo de detección. Varios anticuerpos conjugados están disponibles, tales como (sin ser limitantes), por ejemplo, anticuerpos conjugados con Alexa Fluor®, DyLight®, Rodamina, PE, FITC y Cy3.

Otros métodos para determinar si una inmunoglobulina, anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido u otro agente de unión dirigido contra un objetivo que bloquea (en forma cruzada), es capaz de bloquear (en forma cruzada), se une competitivamente o es competitivo (en forma cruzada) como se define en la presente memoria, se describen, por ejemplo, en Xiao-Chi Jia et al., (Journal of Immunological Methods 288: 91-98, 2004), Miller et al., (Journal of Immunological Methods 365: 118-125, 2011) y/o los métodos descritos en la presente memoria (véase, por ejemplo, el Ejemplo 7).

Se dice que una secuencia de aminoácidos es de "reactividad cruzada" para dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes (tal como por ejemplo, albúmina de suero de dos especies diferentes de mamíferos, tal como, por ejemplo, albúmina de suero humano y albúmina suero cynomolgus ("cyno"), tal como, por ejemplo, CD40L de diferentes especies de mamíferos, tales como, por ejemplo, CD40L humana, CD40L de cyno y CD40L de rata) si es específica para (como se define en la presente memoria) estos diferentes antígenos o determinantes antigénicos. Se apreciará que una secuencia de aminoácidos o polipéptido se puede considerar que tiene reactividad cruzada, aunque la afinidad de unión para los dos antígenos diferentes puede diferir, tal como por un factor, 2, 5, 10, 50, 100 o incluso más siempre y cuando sean específicos para (como se define en el presente documento) estos diferentes antígenos o determinantes antigénicos.

En el contexto de la presente invención, "que modula" o "para modular" generalmente significa alterar una actividad de CD40L, como la medida usando un ensayo celular adecuado *in vitro* o *in vivo* (tal como los mencionados en este documento). En particular, "que modula" o "para modular" puede significar reducir o inhibir una actividad de, o alternativamente, aumentar una actividad de CD40L, medida usando un ensayo celular adecuado *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, tal como los mencionados en este documento), en al menos 1%, preferiblemente al menos 5%, tal como al menos 10% o al menos 25%, por ejemplo en al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o 90% o más, en comparación con la actividad de CD40L en el mismo ensayo bajo las mismas condiciones pero sin la presencia de la inmunoglobulina o polipéptido de la invención.

"Que modula" también puede significar que efectúa un cambio con respecto a uno o más mecanismos biológicos o fisiológicos, efectúa, responde, funciona, enruta o se activa en donde CD40L (o en donde su sustrato o sustratos, ligando o ligandos o ruta o rutas están involucrados, tal como su ruta de señalización o ruta metabólica y sus efectos biológicos o fisiológicos asociados) está involucrada. De nuevo, como será evidente para el experto en la materia, dicha acción puede determinarse de cualquier manera adecuada y/o usando cualquier ensayo adecuado (un ensayo *in vitro* y usualmente celular o *in vivo*) ya conocido, tal como los ensayos descritos en este documento o en la técnica anterior citada en este documento. En particular, una acción puede ser tal que una actividad biológica o fisiológica pretendida se incrementa o disminuye, respectivamente, en al menos 1%, preferiblemente al menos 5%, tal como al menos 10% o al menos 25%, por ejemplo, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o 90% o más, en comparación con la actividad biológica o fisiológica en el mismo ensayo en las mismas condiciones, pero sin la presencia de inmunoglobulina, ISVD o polipéptido de la invención. La modulación puede implicar la reducción y/o inhibición de la activación y/o proliferación de células B y/o células T. La modulación puede implicar la reducción, inhibición y/o eliminación de respuestas inmunes (no deseadas).

Las "actividades de CD40L" y las "actividades por CD40L" (estos términos se usan indistintamente en este documento) incluyen, pero no se limitan a, coestimulación y activación de APC junto con estimulación del receptor de células T por moléculas del MHC en la APC, secreción de todos los isotipos de inmunoglobulinas en presencia de citoquinas, estimulación de proliferación de células B, activación de células B, producción de citoquinas,

cambio de clase de anticuerpos y maduración por afinidad. Por ejemplo, los pacientes con síndrome de hiper-IgM asociado a X expresan CD40 funcional en sus células B, pero sus células T activadas tienen una proteína CD40L defectuosa, lo que resulta en su incapacidad para activar las células B e inducir el cambio de isotipo de inmunoglobulina (Aruffo et al., 1993 Cell 72: 291-300).

Las actividades de CD40L pueden estar mediadas por la interacción con otras moléculas. Las "actividades de CD40L" incluyen la interacción funcional entre CD40L y las siguientes moléculas: CD40 (receptor CD40L, por ejemplo, hCD40 SEQ ID NO: 2), integrina  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 13/4\beta 3$ . Por ejemplo, CD40L se une a su receptor, CD40, que se expresa en una variedad de APC, tales como células B, macrófagos y células dendríticas, así como en células estromales, células endoteliales vasculares y plaquetas. Como tal, las actividades de CD40L incluyen la inducción mediada por CD40 de moléculas coestimuladoras de células T tales como CD80 y CD86 y moléculas inmunoestimulantes tales como IL-12.

Como se usa en este documento, los términos "activar", "activa" y "activado" se refieren a un aumento en una actividad de CD40L medible determinada en al menos un 10% con respecto a una referencia, por ejemplo, al menos 10%, 25%, 50%, 75% o incluso 100% o más. Una actividad de CD40L se "antagoniza" si la actividad se reduce en al menos 10%, y en un ejemplo de realización, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% o incluso 100% (es decir, actividad no detectable), con relación a la ausencia del antagonista. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede antagonizar alguna o toda la actividad de CD40L. En una realización, el polipéptido de la invención no activa la proliferación de células B. En otra realización, el polipéptido de la invención no activa la secreción de citoquina por células T o células dendríticas (DC), donde la citoquina es al menos una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido modula la actividad de CD40L antagonizando una actividad de CD40L.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, donde dicho polipéptido bloquea la unión de CD40L a CD40, preferiblemente en al menos 70%, tal como 80%, 90%, 95% o incluso más, según se determina por competición ligando/se determina por (FACS de activación de células B, como se determina por AlphaScreen, véase también la sección de Ejemplos).

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido antagoniza la inducción mediada por CD40 de moléculas coestimuladoras de células T tales como CD80 y CD86 y moléculas inmunoestimuladoras tales como IL-12.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido antagoniza la activación de las células B.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido no induce sustancialmente la fosforilación de JNK en células T Jurkat o no induce sustancialmente la secreción de IFN- $\gamma$  por células T Jurkat coestimuladas con anticuerpo anti-CD3.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho polipéptido antagoniza la activación de células B, por

ejemplo, como se determina mediante un ensayo IgG de TT, or ejemplo, en un ratón o un mono.

5 En una realización, el polipéptido de la invención no induce sustancialmente la activación de células endoteliales primarias.

10 En una realización, el polipéptido de la invención no induce sustancialmente la activación plaquetaria o agregación plaquetaria, por ejemplo, como se determina mediante un ensayo de activación plaquetaria o un ensayo de agregación plaquetaria.

15 El término "potencia" de un polipéptido de la invención, tal como se usa en la presente memoria, es una función de la cantidad de polipéptido de la invención requerida para que se produzca su efecto específico. Se mide simplemente como el inverso de la  $IC_{50}$  para ese polipéptido. Se refiere a la capacidad de dicho polipéptido de la invención para modular y/o  
20 inhibir parcial o totalmente una actividad de CD40L. Más particularmente, puede referirse a la capacidad de dicho polipéptido para reducir o incluso inhibir totalmente la actividad de la actividad de CD40L como se define en este documento. Como tal, puede referirse a la capacidad de dicho polipéptido para inhibir la proliferación de células T y/o suprimir la activación de células T dando como resultado la inhibición de ciertas respuestas inmunes *in vivo*.

La potencia se puede medir mediante cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica o descrito en la presente memoria.

25 La "eficacia" del polipéptido de la invención mide la fuerza máxima del efecto en sí mismo, a concentraciones saturantes del polipéptido. La eficacia indica la respuesta máxima alcanzable a partir del polipéptido de la invención. Se refiere a la capacidad de un polipéptido para producir el efecto deseado (terapéutico).

30 Las secuencias de aminoácidos se interpretan para significar un solo aminoácido o una secuencia no ramificada de dos o más aminoácidos, dependiendo del contexto. Las secuencias de nucleótidos se interpretan para significar una secuencia no ramificada de 3 o más nucleótidos.

35 Los aminoácidos son aquellos L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en proteínas de origen natural y son comúnmente conocidos en la técnica. Esas secuencias de aminoácidos que contienen D-aminoácidos no están destinadas a ser abarcadas por esta definición. Cualquier péptido o proteína que pueda expresarse como una secuencia de enlaces modificados, enlaces cruzados y protectores de los extremos, enlaces no  
40 peptídicos, etc., está abarcado por esta definición.

Los términos "proteína", "péptido", "proteína/péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente a lo largo de la descripción y cada uno tiene el mismo significado para los fines de esta descripción. Cada término se refiere a un compuesto orgánico hecho de una cadena lineal  
45 de dos o más aminoácidos. El compuesto puede tener diez o más aminoácidos; veinticinco o más aminoácidos; cincuenta o más aminoácidos; cien o más aminoácidos, doscientos o más aminoácidos e incluso trescientos o más aminoácidos. El experto en la técnica apreciará que los polipéptidos generalmente comprenden menos aminoácidos que proteínas, aunque no existe un punto de corte reconocido por la técnica del número de aminoácidos que  
50 distinguen un polipéptido y una proteína; que los polipéptidos pueden prepararse mediante síntesis química o métodos recombinantes; y que las proteínas se preparan generalmente *in vitro* o *in vivo* mediante métodos recombinantes conocidos en la técnica.

Por convención, el enlace amida en la estructura primaria de los polipéptidos está en el orden en que se escriben los aminoácidos, en el que el extremo amino (terminal N) de un polipéptido está siempre a la izquierda, mientras que el extremo ácido (terminal C) está a la derecha.

5

El polipéptido de la invención comprende al menos un CD40L que se une al dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) y preferiblemente también a albúmina de suero que se une a ISVD. En un polipéptido de la invención, los ISVD se pueden unir directamente o unir a través de un enlazador. Incluso más preferiblemente, el polipéptido de la invención comprende una extensión del C-terminal. Como se detallará a continuación, la extensión del C-terminal esencialmente previene/elimina la unión de anticuerpos/factores preexistentes en la mayoría de las muestras de sujetos/pacientes humanos. La extensión del C-terminal está presente en el terminal C del último residuo de aminoácido (generalmente un residuo de serina) del último ISVD (principalmente localizado en el C-terminal).

10

15

Las afinidades relativas pueden depender de la ubicación de los ISVD en el polipéptido. Se apreciará que el orden de los ISVD en un polipéptido de la invención (orientación) se puede elegir de acuerdo con las necesidades de la persona experta en la técnica. El orden de los ISVD individuales, así como si el polipéptido comprende un enlazador es una cuestión de elección de diseño. Algunas orientaciones, con o sin enlazadores, pueden proporcionar características de unión preferidas en comparación con otras orientaciones. Por ejemplo, el orden de un primer ISVD (por ejemplo, ISVD 1) y un segundo ISVD (por ejemplo, ISVD 2) en el polipéptido de la invención puede ser (desde el N-terminal hasta el C-terminal): (i) ISVD 1 (por ejemplo, nanocuerpo 1) - [enlazador] - ISVD 2 (por ejemplo, nanocuerpo 2) - [extensión del C-terminal]; o (ii) ISVD 2 (por ejemplo, nanocuerpo 2) - [enlazador] - ISVD 1 (por ejemplo, nanocuerpo 1) - [extensión del C-terminal]; (donde las fracciones entre los corchetes, es decir, el enlazador y la extensión del C-terminal, son opcionales). Todas las orientaciones están abarcadas por la invención. Los polipéptidos que contienen una orientación de ISVD que proporciona las características de unión deseadas se pueden identificar fácilmente mediante exploración de rutina, por ejemplo, como se ejemplifica en la sección de ejemplos. El orden preferido es desde el N-terminal al C-terminal: CD40L de unión a ISVD - [enlazador] - albúmina sérica de unión a ISVD - [extensión del C-terminal], en donde las fracciones entre los corchetes son opcionales.

20

25

30

35

En los polipéptidos de la invención, los dos o más ISVD, tales como nanoanticuerpos, pueden estar directamente unidos entre sí (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/23221) y/o pueden estar unidos entre sí a través de uno o más enlazadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos. Los enlazadores adecuados para uso en los polipéptidos de la invención serán claros para los expertos en la materia, y en general pueden ser cualquier enlazador utilizado en la técnica para unir secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, dicho enlazador es adecuado para uso en la construcción de proteínas o polipéptidos que están destinados para uso farmacéutico.

40

45

Algunos enlazadores particularmente preferidos incluyen los enlazadores que se usan en la técnica para unir fragmentos de anticuerpos o dominios de anticuerpos. Estos incluyen los enlazadores mencionados en las publicaciones citadas anteriormente, así como por ejemplo los enlazadores que se usan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos ScFv (a este respecto, sin embargo, debe observarse que, mientras que en los diacuerpos y en los fragmentos ScFv, la secuencia del enlazador utilizada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permitan que los dominios pertinentes  $V_H$  y  $V_L$  se unan para formar el sitio completo de unión al antígeno, no existe una limitación particular en la longitud o la flexibilidad del enlazador usado en el polipéptido de la invención, ya que cada ISVD, tal como un nanocuerpo por sí mismo forma un sitio completo de unión a antígeno).

50

Por ejemplo, un enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos o una secuencia adecuada de aminoácidos, y en particular secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferiblemente entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos preferidos de tales secuencias de aminoácidos incluyen enlazadores gly-ser, por ejemplo del tipo  $(gly_xser_y)_z$ , tales como (por ejemplo  $(gly_4ser)_3$  o  $(gly_3ser_2)_3$ , como se describe en el documento WO 99/42077 y los enlazadores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las aplicaciones de Ablynx mencionadas en este documento (véase, por ejemplo, los documentos WO 06/040153 y WO 06/122825), así como regiones de tipo bisagra, tales como las regiones bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de forma natural o secuencias similares (tales como las descritas en el documento WO 94/04678). Los enlazadores preferidos se describen en la Tabla 1.

Algunos otros enlazadores particularmente preferidos son poli-alanina (tales como AAA), así como los enlazadores GS30 (SEQ ID NO: 85 en WO 06/122825) y GS9 (SEQ ID NO: 84 en el documento WO 06/122825). En un aspecto preferido, el conector se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18-29 y 77, preferiblemente SEQ ID NO: 21.

Está comprendido dentro del alcance de la invención que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del enlazador o enlazadores utilizados (aunque no crítico, como suele ser para los enlazadores utilizados en fragmentos ScFv) pueden tener alguna influencia sobre las propiedades del polipéptido final de la invención, que incluyen, pero no se limitan a, la afinidad, especificidad o avidéz por una quimioquina, o por uno o más de los otros antígenos. Con base en la descripción en este documento, la persona experta podrá determinar el enlazador o enlazadores óptimos para usar en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Cuando se usan dos o más enlazadores en los polipéptidos de la invención, estos enlazadores pueden ser iguales o diferentes. De nuevo, con base en la descripción en este documento, la persona experta será capaz de determinar los enlazadores óptimos para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

En los polipéptidos de la invención, los ISVD pueden estar precedidos por una extensión del extremo terminal. En el contexto de la presente invención, la extensión del N-terminal consiste en una secuencia de aminoácidos de al menos un residuo de aminoácido hasta un máximo de 40 residuos de aminoácidos, preferiblemente entre 2 y 30 residuos de aminoácidos, tales como entre 2 y 20 residuos de aminoácidos, tales como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos. La extensión del N-terminal está presente terminalmente en N con respecto al primer residuo de aminoácido (es decir, el localizado más terminalmente hacia N, generalmente designado por aminoácido 1 de acuerdo con la numeración de Kabat) del primer ISVD (es decir, el localizado, más terminalmente hacia N) en el polipéptido de la invención. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende una extensión del N-terminal.

Como se detalla más adelante, los ISVD pueden derivarse de un dominio  $V_{HH}$ ,  $V_H$  o  $V_L$ , sin embargo, los ISVD se eligen de tal manera que no formen pares complementarios de dominios  $V_H$  y  $V_L$  en los polipéptidos de la invención. El nanocuerpo,  $V_{HH}$  y  $V_{HH}$  humanizado son inusuales ya que se derivan de anticuerpos de camélidos naturales que no tienen cadenas ligeras, y de hecho estos dominios no pueden asociarse con cadenas ligeras de camélidos para formar pares complementarios de  $V_{HH}$  y  $V_L$ . Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención no comprenden ISVD complementarios y/o forman pares complementarios de ISVD, tales como, por ejemplo, pares  $V_H/V_L$  complementarios.

La presente invención se refiere a un polipéptido tal como se describe en la presente memoria, en el que dicho enlazador se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18-29 y 77.

5 También está contemplado que el polipéptido de acuerdo con la invención se pueda  
conjugarse con una molécula adicional. La molécula adicional puede conjugarse con el  
polipéptido directamente o mediante un espaciador de longitud adecuada. Para fines  
terapéuticos, la conjugación con un grupo efector terapéutico, tal como un grupo radioactivo,  
10 es decir, un grupo que consiste en o que comprende un radioisótopo o radionúclido (por  
ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ), una toxina o un grupo  
citotóxico, por ejemplo, un inhibidor de crecimiento celular puede ser adecuados. En otro  
aspecto, el polipéptido de la invención se puede acoplar a un grupo marcador (polipéptido  
15 marcado), que luego se puede usar, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Los grupos  
marcadores adecuados se pueden seleccionar de radioisótopos (por ejemplo, los  
mencionados anteriormente) o grupos que contienen un radioisótopo, radionucleidos, grupos  
fluorescentes (por ejemplo, proteínas fluorescentes tales como GFP, RFP, etc., colorantes  
Alexa-Fluor®, rodaminas, fluoresceína y sus derivados tales como FITC, colorantes de  
cianina tales como Cy3® y Cy5®), grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano  
20 picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico,  
partículas de metal (por ejemplo, partículas de oro), partículas magnéticas (por ejemplo, con  
un núcleo que contienen magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y/o maghemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )), grupos de polipéptidos  
predeterminados, etc.

25 A menos que se indique lo contrario, los términos "inmunoglobulina" y "secuencia de  
inmunoglobulina", ya se usen para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un  
anticuerpo convencional de 4 cadenas, se usan como un término general para incluir tanto el  
anticuerpo de tamaño completo, cadenas individuales de los mismos, así como todas las  
partes, dominios o fragmentos de los mismos (que incluyen, pero no se limitan a, dominios  
de unión a antígeno o fragmentos tales como dominios  $V_{\text{HH}}$  o dominios  $V_{\text{H}}/V_{\text{L}}$ ,  
30 respectivamente).

El término "dominio" (de un polipéptido o proteína) como se usa en el presente documento  
se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene la capacidad de retener su  
estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios  
35 son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos  
casos se pueden agregar, eliminar o transferir a otras proteínas sin pérdida de función del  
resto de la proteína y/o del dominio.

40 El término "dominio de inmunoglobulina" como se usa en el presente documento se refiere a  
una región globular de una cadena de anticuerpo (tal como, por ejemplo, una cadena de un  
anticuerpo convencional de 4 cadenas o de un anticuerpo de cadena pesada), o a un  
polipéptido que esencialmente consiste en tal región globular. Los dominios de  
inmunoglobulina se caracterizan porque retienen la característica de plegamiento de  
inmunoglobulina de las moléculas de anticuerpo, que consiste en un sándwich de dos capas  
45 de aproximadamente siete cadenas beta antiparalelas dispuestas en dos láminas beta,  
opcionalmente estabilizadas mediante un enlace disulfuro conservado.

El término "dominio variable de inmunoglobulina" como se usa en el presente documento  
significa un dominio de inmunoglobulina que consiste esencialmente en cuatro "regiones  
50 marco" a las que se hace referencia en la técnica y a continuación como "región marco 1" o  
"FR1"; como "región marco 2" o "FR2"; como "región marco 3" o "FR3"; y como "región  
marco 4" o "FR4", respectivamente; cuyas regiones marco están interrumpidas por tres  
"regiones determinantes de complementariedad" o "CDR", que se mencionan en la técnica y  
en el presente documento a continuación como "región 1 determinante de

complementariedad" o "CDR1"; como "región 2 determinante de complementariedad" o "CDR2"; y como "región 3 determinante de complementariedad" o "CDR3", respectivamente. Por lo tanto, la estructura o secuencia general de un dominio variable de inmunoglobulina se puede indicar de la siguiente manera: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3- CDR3 - FR4. Es el dominio o dominios variables de inmunoglobulina que confieren especificidad a un anticuerpo para el antígeno llevando el sitio de unión al antígeno.

Las CDR preferidas se representan en la Tabla A-2, es decir, CDR1 se selecciona de las SEQ ID NOs: 40, 47, 54, 61, 68 y 33, CDR2 se selecciona de las SEQ ID NOs: 42, 49, 56, 63, 70 y 35; y CDR3 se selecciona de las SEQ ID NOs: 44, 51, 58, 65, 72 y 37. Preferiblemente, CDR1, CDR2 y CDR3 se eligen de un clon, por ejemplo,

- CDR1 es la SEQ ID NO: 33, CDR2 es la SEQ ID NO: 35 y CDR3 es la SEQ ID NO: 37;
- CDR1 es la SEQ ID NO: 61, CDR2 es la SEQ ID NO: 63 y CDR3 es la SEQ ID NO: 65;
- CDR1 es la SEQ ID NO: 40, CDR2 es la SEQ ID NO: 42 y CDR3 es la SEQ ID NO: 44;
- CDR1 es la SEQ ID NO: 68, CDR2 es la SEQ ID NO: 70 y CDR3 es la SEQ ID NO: 72;
- CDR1 es la SEQ ID NO: 47, CDR2 es la SEQ ID NO: 49 y CDR3 es la SEQ ID NO: 51; o
- CDR1 es la SEQ ID NO: 54, CDR2 es la SEQ ID NO: 56 y CDR3 es la SEQ ID NO: 58.

El término "dominio variable único de inmunoglobulina", utilizado intercambiamente con "dominio variable único", define moléculas en las que el sitio de unión al antígeno está presente en, y formado por, un dominio único de inmunoglobulina. Esto establece dominios variables individuales de inmunoglobulina aparte de inmunoglobulinas "convencionales" o sus fragmentos, en donde dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. Típicamente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tanto de  $V_H$  como de  $V_L$  contribuirán al sitio de unión al antígeno, es decir, un total de 6 CDR participarán en la formación del sitio de unión al antígeno.

Los ISVD preferidos se representan en la Tabla A-1, es decir, las SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 78, 79, 80, 81 y 82, lo más preferiblemente las SEQ ID NOs: 8, 6, 7 y 3.

En vista de la definición anterior, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo convencional de 4 cadenas (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 Fv unido por disulfuro o un fragmento scFv, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivado de dicho anticuerpo convencional de 4 cadenas, normalmente no se consideraría un dominio variable único de inmunoglobulina, como en estos casos, la unión al epítipo respectivo de un antígeno normalmente no ocurriría en un dominio de inmunoglobulina (único) sino en un par de dominios de inmunoglobulina (asociados) tales como dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par de dominios de inmunoglobulina  $V_H$ - $V_L$ , que se unen conjuntamente a un epítipo del antígeno respectivo.

Por el contrario, los dominios variables individuales de inmunoglobulina son capaces de unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un dominio  $V_{HH}$ ,  $V_H$  o  $V_L$  único. Por lo tanto, el sitio de unión a antígeno de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por no más de tres CDR.

Como tal, el dominio variable único puede ser una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de  $V_L$ ) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de  $V_H$  o

secuencia de  $V_{HH}$ ) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una única unidad de unión a antígeno (es decir, una unidad de unión a antígeno funcional que consista esencialmente en el dominio variable único, de modo que el dominio de unión a antígeno único no necesite interactuar con otro dominio variable para formar una unidad funcional de unión al antígeno).

En una realización de la invención, los dominios variables individuales de inmunoglobulina son secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de  $V_H$ ); más específicamente, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas o secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio (único) (o un aminoácido que es adecuado para usar como un anticuerpo de dominio (único)), un "dAb" o dAb (o un aminoácido que es adecuado para uso como un dAb) o un nanocuerpo (como se define en este documento, y que incluye, pero no se limita a, un  $V_{HH}$ ); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de los mismos.

En particular, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un Nanobody® (como se define en la presente memoria) o un fragmento adecuado del mismo. [Nota: Nanobody®, Nanobodies® y Nanoclone® son marcas registradas de Ablynx N.V.]. Para una descripción general de nanoanticuerpos, se hace referencia a la descripción adicional a continuación, así como a la técnica anterior citada en la presente memoria, tal como, por ejemplo, descrito en el documento WO 08/020079 (página 16).

Los "dominios  $V_{HH}$ ", también conocidos como  $V_{HH}$ , dominios  $V_{HH}$ , fragmentos de anticuerpos  $V_{HH}$  y anticuerpos  $V_{HH}$ , se han descrito originalmente como el dominio de inmunoglobulina (variable) de unión a antígeno de "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, de "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras" "Hamers-Casterman et al., 1993 Nature 363: 446-448). El término "dominio  $V_{HH}$ " se ha elegido para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas (a los que se hace referencia en este documento como "dominios  $V_H$ " o "dominios  $VH$ ") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en los anticuerpos convencionales de 4 cadenas (a los que se hace referencia en este documento como "dominios  $V_L$ " o "dominios  $VL$ "). Para una descripción adicional de los  $V_{HH}$  y los nanoanticuerpos, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001), así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como antecedentes generales de la técnica: WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; WO 01/90190 del Consejo Nacional de Investigación de Canadá; WO 03/025020 (= EP 1433793) del Instituto de Anticuerpos; así como en los documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825, de Ablynx NV y las solicitudes de patente publicadas adicionales de Ablynx NV. También se hace referencia a la técnica anterior mencionada en estas aplicaciones, y en particular a la lista de referencias mencionadas en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153, cuya lista y referencias se incorporan aquí como referencia. Como se describe en estas referencias, los nanoanticuerpos (en particular secuencias de  $V_{HH}$  y nanoanticuerpos parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por

la presencia de uno o más "residuos de contraste" en una o más de las secuencias marco. Una descripción adicional de los nanoanticuerpos, que incluye la humanización y/o la camelización de nanoanticuerpos, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o "fusiones de nanoanticuerpos", construcciones multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitantes de secuencias enlazadoras) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los nanoanticuerpos y sus preparaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164. Para una descripción general adicional de nanoanticuerpos, se hace referencia a la técnica anterior citada en este documento, tal como, por ejemplo, se describe en el documento WO 08/020079 (página 16).

Los "anticuerpos de dominio", también conocidos como "Dab", "Anticuerpos de Dominio" y "dAb" (los términos "Anticuerpos de Dominio" y "dAbs" utilizados como marcas por el grupo de compañías GlaxoSmithKline) se han descrito en, por ejemplo, en el documento EP 0368684, Ward et al., (Nature 341: 544 - 546, 1989), Holt et al., (Trends in Biotechnology 21: 484-490, 2003) y en el documento WO 03/002609 así como, por ejemplo, en los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltda. Los anticuerpos de dominio corresponden esencialmente a los dominios VH o VL de mamíferos no camélidos, en particular anticuerpos humanos de 4 cadenas. Para unir un epítipo como un único dominio de unión a antígeno, es decir, sin emparejarse con un dominio VL o VH, respectivamente, se requiere una selección específica para tales propiedades de unión a antígeno, por ejemplo, mediante el uso de bibliotecas de secuencias de dominio VH o VL únicas humanas. Los anticuerpos de dominio tienen, como VHH, un peso molecular de aproximadamente 13 a aproximadamente 16 kDa y, si se derivan de secuencias completamente humanas, no requieren humanización para, por ejemplo, uso terapéutico en humanos.

También debe observarse que, aunque son menos preferidos en el contexto de la presente invención porque no son de origen mamífero, pueden derivarse dominios variables únicos de ciertas especies de tiburones (por ejemplo, los denominados "dominios IgNAR", véase, por ejemplo, el documento WO 05/18629).

Por lo tanto, en el sentido de la presente invención, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" o "dominio variable único" comprende polipéptidos que se derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Pueden ser humanizados, como se describió previamente. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes no de camélidos, por ejemplo, de ratón o humano, que se han "camelizado", como, por ejemplo, se describe en Davies y Riechmann (FEBS 339: 285-290, 1994; Biotechnol., 13: 475-479, 1995; Prot. Eng. 9: 531-537, 1996). y Riechmann y Muyldermans (J. Immunol. Methods 231: 25-38, 1999).

Los residuos de aminoácidos de un dominio VHH están numerados de acuerdo con la numeración general para dominios VH dado por Kabat et al., ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91), tal 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). En la técnica se conocen métodos alternativos para numerar los residuos de aminoácidos de los dominios V<sub>H</sub>, métodos que también se pueden aplicar de manera análoga a los dominios VHH. Sin embargo, en la presente descripción, las reivindicaciones y las figuras, se seguirá la numeración de acuerdo a Kabat aplicada a los dominios VHH como se describió anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

Debe observarse que, como es bien conocido en la técnica para los dominios V<sub>H</sub> y VHH, el número total de residuos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácidos indicado por la numeración de

Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat puede no estar ocupada en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, en general, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácidos en la secuencia real. El número total de residuos de aminoácidos en un dominio VH y un dominio VHH estará generalmente en el intervalo de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las secuencias más pequeñas y más largas también pueden ser adecuadas para los fines descritos en la presente memoria.

La determinación de regiones CDR también puede realizarse de acuerdo con diferentes métodos. En la determinación de CDR según Kabat, FR1 de un VHH comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30, CDR1 de un VHH comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 31-35, FR2 de un VHH comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un VHH comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-65, FR3 de un VHH comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 66-94, CDR3 de un VHH comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y FR4 de un VHH comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

En la presente solicitud, sin embargo, las secuencias de CDR se determinaron de acuerdo con Kontermann y Dübel (Eds., Antibody Engineering, Vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlín, Martin, Capítulo 3, páginas 33-51, 2010). De acuerdo con este método, FR1 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-25, CDR1 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 26-35, FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-58, FR3 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 59-94, CDR3 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y FR4 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina tales como anticuerpos de dominio y nanoanticuerpos (que incluyen dominios VHH) pueden someterse a humanización. En particular, los dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizada, tales como nanoanticuerpos (que incluyen dominios VHH) pueden ser dominios variables individuales de inmunoglobulina que se definen como generalmente en los párrafos anteriores, pero en los que está presente al menos un residuo de aminoácido (y en particular, en al menos uno de los residuos del marco) que es y/o que corresponde a una sustitución humanizante (como se define en la presente memoria). Se pueden determinar sustituciones humanizantes potencialmente útiles comparando la secuencia de las regiones marco de una secuencia  $V_{HH}$  natural con la correspondiente secuencia marco de una o más secuencias  $V_H$  humanas estrechamente relacionadas, después de lo cual una o más de las sustituciones humanizantes potencialmente útiles (o combinaciones de las mismas) así determinadas puede introducirse en dicha secuencia  $V_{HH}$  (de cualquier forma ya conocida, como se describe adicionalmente en la presente memoria) y las secuencias  $V_{HH}$  humanizadas resultantes se pueden probar para determinar la afinidad por el objetivo, la estabilidad, la facilidad y el nivel de expresión, y/o para otras propiedades deseadas. De esta manera, mediante un grado limitado de ensayo y error, el experto puede determinar otras sustituciones humanizantes adecuadas (o combinaciones adecuadas de las mismas) con base en la descripción en el presente documento. Además, con base en lo anterior, (las regiones marco de) un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un nanoanticuerpo (que incluye dominios VHH) puede estar parcialmente humanizado o totalmente humanizado.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina tales como anticuerpos de dominio y nanoanticuerpos (que incluyen dominios VHH y dominios VHH humanizados), también pueden someterse a maduración por afinidad mediante la introducción de una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de una o más CDR, cuyas alteraciones dan como resultado una mejor afinidad del dominio variable único de inmunoglobulina resultante para su antígeno respectivo, en comparación con la molécula parental respectiva. Las moléculas de dominio variable único de inmunoglobulina maduras por afinidad de la invención se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe por Marks et al., (Biotechnology 10: 779-783, 1992), Barbas, et al., (Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809 - 3813, 1994), Shier et al., (Gene 169: 147 - 155, 1995), Yelton et al. (Immunol., 155: 1994-2004, 1995), Jackson et al., (J. Immunol., 154: 3310-9, 1995), Hawkins et al., (J. Mol. Biol. 226: 889-896, 1992), Johnson and Hawkins (Affinity maturation of antibodies using phage display, Oxford University Press, 1996).

El proceso de diseñar/seleccionar y/o preparar un polipéptido, comenzando a partir de un dominio variable único de inmunoglobulina tal como un  $V_H$ ,  $V_L$ ,  $V_{HH}$ , dominio de anticuerpo o un nanoanticuerpo, también se denomina aquí "formatear" dicho dominio variable único de inmunoglobulina; y un dominio variable único de inmunoglobulina que forma parte de un polipéptido se dice que está "formateado" o que está "en el formato de" dicho polipéptido. Los ejemplos de formas en las que un dominio variable único de inmunoglobulina se puede formatear y los ejemplos de tales formatos serán claros para la persona experta en la materia con base en la divulgación presentada en el presente documento; y dicho dominio variable único de inmunoglobulina formateado forma un aspecto adicional de la invención.

Por ejemplo, y sin limitación, uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina se pueden usar como una "unidad de unión", "dominio de unión" o "bloque de construcción" (estos términos se usan en este documento de forma intercambiable) para la preparación de un polipéptido, que puede opcionalmente contener uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina adicionales que pueden servir como una unidad de unión (es decir, contra el mismo u otro epítipo en CD40L y/o contra uno o más antígenos, proteínas u objetivos distintos de CD40L).

Los polipéptidos monovalentes comprenden o consisten esencialmente en una sola unidad de unión (tal como, por ejemplo, dominios variables individuales de inmunoglobulina). Los polipéptidos que comprenden dos o más unidades de unión (tales como, por ejemplo, dominios variables individuales de inmunoglobulina) también se denominarán en la presente memoria como polipéptidos "multivalentes", y las unidades de unión/dominios variables individuales de inmunoglobulina presentes en tales polipéptidos también se denominarán en la presente memoria como estando en un "formato multivalente". Por ejemplo, un polipéptido "bivalente" puede comprender dos dominios variables individuales de inmunoglobulina, opcionalmente unidos a través de una secuencia enlazadora, mientras que un polipéptido "trivalente" puede comprender tres dominios variables individuales de inmunoglobulina, opcionalmente unidos a través de dos secuencias enlazadoras; mientras que un polipéptido "tetraivalente" puede comprender cuatro dominios variables individuales de inmunoglobulina, opcionalmente unidos a través de tres secuencias enlazadoras, etc.

En un polipéptido multivalente, los dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser iguales o diferentes, y pueden dirigirse contra el mismo antígeno o determinante antigénico (por ejemplo, contra la misma parte o partes o epítipo o epítopos o contra diferentes partes o epítopos) o alternatively puede dirigirse contra diferentes antígenos o determinantes antigénicos; o cualquier combinación adecuada de los mismos. Los polipéptidos que contienen al menos dos unidades de unión (tales como, por ejemplo, dominios variables individuales de inmunoglobulina) en los que al menos una unidad de unión se dirige contra un primer antígeno (es decir, CD40L) y al menos una

unidad de unión se dirigen contra un segundo antígeno (es decir, diferente de CD40L) también se denominarán polipéptidos "multiespecíficos", y las unidades de unión (tales como, por ejemplo, dominios variables individuales de inmunoglobulina) presentes en dichos polipéptidos también se denominarán en la presente memoria como un "formato multiespecífico". Así, por ejemplo, un polipéptido "biespecífico" de la invención es un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina dirigido contra un primer antígeno (es decir, CD40L) y al menos otro dominio variable único de inmunoglobulina dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de CD40L), mientras que un polipéptido "triespecífico" de la invención es un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina dirigido contra un primer antígeno (es decir, CD40L), al menos otro dominio variable único de inmunoglobulina dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de CD40L) y al menos otro dominio variable único de inmunoglobulina dirigido contra un tercer antígeno (es decir, diferente tanto de CD40L como del segundo antígeno); etc.

Los "polipéptidos multiparatópicos", tales como, por ejemplo, "polipéptidos biparatópicos" o "polipéptidos triparatópicos", comprenden o consisten esencialmente de dos o más unidades de unión que tienen cada una un paratopo diferente.

Preferiblemente, el polipéptido de la invención es un polipéptido biespecífico que comprende un primer ISVD (por ejemplo, un CD40L que se une a ISVD) y un segundo ISVD (por ejemplo, una albúmina de suero que se une a ISVD).

Un medio para mejorar la eficacia de un anticuerpo terapéutico es aumentar su persistencia en suero, permitiendo de ese modo mayores niveles circulantes, una administración menos frecuente y dosis reducidas.

En la técnica, se han descrito grupos o fracciones que extienden la semivida de una molécula *in vivo*, tales como grupos PEG de regiones Fc.

Sin embargo, la región Fc de un anticuerpo no solo media su semivida en suero, sino también sus funciones efectoras, tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), que tienen un impacto negativo sobre la seguridad.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, un hallazgo reciente demostró una ocurrencia de 22-25% de anticuerpos anti-PEG en donantes de sangre sanos. Este desarrollo de anticuerpos anti-PEG, que puede limitar la eficacia en algunos pacientes, es contrario a la suposición general de que el PEG no es inmunogénico. Por lo tanto, los agentes terapéuticos PEGilados tienen implicaciones potenciales para el uso clínico, especialmente en un contexto de enfermedad inmune comprometida. Además, se informó que la PEGilación de la molécula Fab' anti-CD40L disminuyó su actividad en 4 a 5 veces (documento US2010/0104573).

Los presentes inventores pudieron rediseñar los ISVD para que no solo superaran al CDP7657 de referencia, sino que también conservaran este rendimiento tras la extensión de la semivida. En un aspecto específico, pero no limitante de la invención, que se describirá adicionalmente en el presente documento, los polipéptidos de la invención tienen una semivida aumentada en suero (como se describe adicionalmente en este documento) en comparación con el CD40L de unión al dominio variable único de inmunoglobulina.

La "semivida" de un polipéptido de la invención generalmente se puede definir como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 y como se menciona en este documento se refiere al tiempo necesario para que la concentración en

suero del polipéptido se reduzca en un 50%, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del polipéptido y/o eliminación o secuestro del polipéptido por mecanismos naturales. La semivida *in vivo* de un polipéptido de la invención puede determinarse de cualquier manera ya conocida, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán  
5 claras para las personas expertas en la técnica, y pueden, por ejemplo, generalmente ser como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079. Como también se menciona en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079, la semivida se puede expresar usando parámetros tales como el  $t_{1/2-\alpha}$ ,  $t_{1/2-\beta}$  y el área bajo la curva (AUC). Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, tales como Kenneth  
10 et al., (Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, John Wiley & Sons Inc, 1986) y Gibaldi & Perron ("Pharmacokinetics", Marcel Dekker, 2da Rev. Edición, 1982). Los términos "aumento en la semivida" o "semivida aumentada" también se definen en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 y en particular se refieren a un aumento en el  $t_{1/2-\beta}$ , ya sea con o sin un aumento en el  $t_{1/2-\alpha}$  y/o el AUC o ambos.

En un aspecto específico de la invención, un polipéptido de la invención tiene una semivida aumentada, en comparación con el polipéptido correspondiente que carece de una proteína sérica que se une a ISVD. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales polipéptidos serán claros para los expertos en la presente divulgación y comprenden, por  
20 ejemplo, polipéptidos de la invención que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen a una proteína sérica (tal como albúmina de suero); o polipéptidos de la invención que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de la invención que está unida con al menos una fracción (y en particular al menos una secuencia de aminoácidos) que aumenta la semivida de la secuencia de aminoácidos de la invención.  
25 Los ejemplos de polipéptidos de la invención que comprenden tales fracciones de extensión de semivida o dominios variables individuales de inmunoglobulina serán claros para el experto en la materia con base en la divulgación adicional en el presente documento; y por ejemplo incluyen, sin limitación, polipéptidos en los que uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina de la invención están unidos adecuadamente a una o más proteínas séricas o fragmentos de las mismas (tales como albúmina de suero (humana) o fragmentos adecuados de la misma) o a una o más unidades de unión que pueden unirse a  
30 proteínas séricas (tales como, por ejemplo, ISVD, anticuerpos de dominio, anticuerpos de dominio único, "dAb" o nanoanticuerpos que pueden unirse a proteínas séricas tales como albúmina de suero (tal como albúmina de suero humana), inmunoglobulinas séricas tales como IgG o transferrina; se hace referencia a la descripción y referencias adicionales mencionadas en esta memoria); los polipéptidos de la invención que comprenden una o más proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas, tales como, sin limitación, las proteínas y péptidos descritos en los documentos WO 91/01743, WO  
35 01/45746, WO 02/076489, WO2008/068280, WO2009/127691 y PCT/EP2011/051559.

Generalmente, los compuestos o polipéptidos de la invención con semivida aumentada tienen preferiblemente una semivida que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención, por  
45 ejemplo, el CD40L mismo que se une a ISVD (sin la albúmina de suero que se une a ISVD). Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de la invención con semivida aumentada pueden tener una semivida, por ejemplo, en humanos que se incrementa con más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención, por ejemplo, CD40L mismo que se une a ISVD.  
50

En un aspecto preferido, pero no limitante de la invención, dichos compuestos o polipéptidos de la invención tienen una semivida en suero, por ejemplo, en humanos que se incrementa

con más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención, por ejemplo, CD40L mismo que se une a ISVD.

5

En otro aspecto preferido, pero no limitante de la invención, tales compuestos o polipéptidos de la invención exhiben una semivida en suero en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más. Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de la invención pueden tener una semivida de al menos 5 días (tal como aproximadamente 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (como aproximadamente 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente 14 a 19 días).

10

15

En un aspecto preferido, la presente invención también se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicha albúmina de suero que se une a ISVD consiste esencialmente de 4 regiones marco (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en las que CDR1 es la SEQ ID NO: 74, CDR2 es la SEQ ID NO: 75 CDR1 es la SEQ ID NO: 76 (véase la Tabla A-3).

20

En un aspecto particularmente preferido, pero no limitante de la invención, la invención proporciona un polipéptido de la invención que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que se une específicamente a CD40L y al menos una albúmina de suero que se une a ISVD, por ejemplo, la albúmina de suero que se une a ISVD se selecciona del grupo que consiste en ALB135 (SEQ ID NO: 15), ALB129 (SEQ ID NO: 13), ALB8 (SEQ ID NO: 11), ALB23 (SEQ ID NO: 12) y ALB132 (SEQ ID NO: 14), preferiblemente SEQ ID NO: 15.

25

30

Las respuestas inmunes a los productos proteicos terapéuticos pueden plantear problemas tanto para la seguridad del paciente como para la eficacia del producto. Los eventos tromboembólicos también pueden deberse a anticuerpos preexistentes (PEA) y/o anticuerpos antifármaco (ADA) contra una proteína terapéutica. A este respecto, la inmunogenicidad es la propensión del producto de proteína terapéutica a generar respuestas inmunes para sí mismo y a proteínas relacionadas o para inducir eventos clínicos adversos relacionados inmunológicamente.

35

40

Los presentes inventores pudieron diseñar polipéptidos que eran significativamente más seguros que los anticuerpos de la técnica anterior.

En la investigación que conduce a la presente invención, después de haber establecido que la adición de la extensión del C-terminal (que puede ser tan simple como un residuo de alanina C-terminal simple, véase nuevamente el documento WO 12/175741, Ejemplo 3) a la región C-terminal o extremo de un ISVD esencialmente previene/elimina la unión de anticuerpos/factores preexistentes en la mayoría de las muestras de sujetos/pacientes humanos, se investigó si las muestras obtenidas de sujetos humanos (voluntarios sanos y/o sujetos que padecían una enfermedad o trastorno) posiblemente contienen (otros) anticuerpos o factores preexistentes que pueden unirse a la región C-terminal expuesta de un nanoanticuerpo (u otro ISVD) incluso cuando está presente una extensión C-terminal. Al hacerlo, los presentes inventores han encontrado que, aunque esencialmente no se encuentran anticuerpos preexistentes que se unen a un ISVD terminalmente en C extendido

45

50

5 en la sangre o suero de voluntarios sanos o en sangre o suero obtenido de pacientes humanos que padecen de una entre una cantidad de enfermedades diferentes (incluidas algunas enfermedades inflamatorias o trastornos autoinmunes, datos no mostrados), algunas muestras de sangre o suero que se han obtenidas de ciertos (pero no todos) los sujetos humanos que padecen ciertos trastornos graves (auto) inmunes (como SLE) parece 5 contener algunos anticuerpos/factores preexistentes que pueden unirse a los ISVD incluso cuando dichos ISVD comprenden una extensión C-terminal.

10 Los presentes inventores se propusieron proporcionar ISVD mejorados que, cuando tienen una región o extremo C-terminal expuesta, son menos propensos a la unión por anticuerpos/factores preexistentes, tales como los que se encuentran en muestras de sangre o suero obtenidas de sujetos humanos que padecen ciertas enfermedades (auto) inmunes o trastornos que impactan severamente/activan el sistema inmune (tal como SLE).

15 Se encontró que la unión de anticuerpos/factores preexistentes a un ISVD con un extremo C-terminal expuesto puede reducirse (adicionalmente) mediante una mutación de la serina en la posición 112 (numeración de Kabat) a lisina (K) o glutamina (Q). En particular, se ha encontrado que tal mutación S112K o S112Q de este tipo puede (además) reducir o 20 esencialmente prevenir/eliminar la unión de anticuerpos/factores preexistentes que pueden unirse a un ISVD que comprende una extensión C-terminal (pero no una mutación S112K o S112Q), tales como los anticuerpos/factores preexistentes que se encuentran en la sangre o el suero de sujetos humanos que padecen trastornos autoinmunes graves tales como SLE.

25 Este hallazgo es ampliamente aplicable.

Las inmunoglobulinas (y en particular los dominios variables individuales de inmunoglobulina) de la invención también pueden contener las mutaciones/residuos de aminoácidos específicos descritos en las siguientes solicitudes provisionales de EE.UU. en 30 tramite junto con la presente, todas tituladas "Dominios variables mejorados de inmunoglobulina": documento US 61/994552 presentado el 16 de mayo de 2014; el documento US 61/014,015 presentado el 18 de junio de 2014; el documento US 62/040.167 presentado el 21 de agosto de 2014; y el documento US 62/047.560 presentado el 8 de septiembre de 2014 (todos asignados a Ablynx N.V.).

35 En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en este documento, que comprende un ISVD, preferiblemente un ISVD localizado terminalmente en C, incluso más preferiblemente dicho ISVD localizado terminalmente en C es una albúmina de suero que se une a ISVD, en la que: (i) el residuo de aminoácido en la posición 112 es uno de K o Q; y/o (ii) el residuo de aminoácido en la posición 89 es T; y/o (iii) el residuo de 40 aminoácido en la posición 89 es L y el residuo de aminoácido en la posición 110 es uno de K o Q; y (iv) en cada uno de los casos (i) a (iii), el aminoácido en la posición 11 es preferiblemente V; y en el que dicho dominio VH contiene una extensión C-terminal (X)<sub>n</sub>, en la que n es 1 a 10, preferiblemente 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se 45 elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I)

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, que comprende un ISVD, preferiblemente un ISVD localizado 50 terminalmente en C, incluso más preferiblemente dicho ISVD localizado terminalmente en C es una albúmina de suero que se une a ISVD, en el que:

- el residuo de aminoácido en la posición 11 es uno de L, V o K; y
- el residuo de aminoácido en la posición 14 es uno de A o P; y
- el residuo de aminoácido en la posición 41 es uno de A o P; y

- el residuo de aminoácido en la posición 89 es uno de T, V o L; y
  - el residuo de aminoácido en la posición 108 es uno de Q o L; y
  - el residuo de aminoácido en la posición 110 es uno de T, K o Q; y
  - el residuo de aminoácido en la posición 112 es uno de S, K o Q;
- 5 en el que o bien (i) el residuo de aminoácido en la posición 112 es uno de K o Q; y/o (ii) el residuo de aminoácido en la posición 89 es T; y/o (iii) el residuo de aminoácido en la posición 89 es L y el residuo de aminoácido en la posición 110 es uno de K o Q; y (iv) en cada uno de los casos (i) a (iii), el aminoácido en la posición 11 es preferiblemente V.
- 10 Como se menciona en dichas solicitudes provisionales de Estados Unidos en trámite junto con la presente, dichas mutaciones son eficaces para prevenir o reducir la unión de los denominados "anticuerpos preexistentes" a las inmunoglobulinas y compuestos de la invención. Para este propósito, las inmunoglobulinas de la invención también pueden
- 15 contener (opcionalmente en combinación con dichas mutaciones) una extensión C-terminal (X)<sub>n</sub> (en la que n es 1 a 10, preferiblemente 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1), y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I)), para lo cual se hace referencia nuevamente a dichas solicitudes provisionales de EE. UU., así como al
- 20 documento WO 12/175741. En particular, una inmunoglobulina de la invención puede contener dicha extensión C-terminal cuando forma el extremo C-terminal de una proteína, polipéptido u otro compuesto o constructo que comprende la misma (de nuevo, como se describe adicionalmente en dichas solicitudes provisionales de EE. UU., así como el documento WO 12/175741).
- 25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos un ISVD que se une específicamente a CD40L y comprende además una albúmina de suero que se une a ISVD, en el que dicha albúmina de suero de unión a ISVD se selecciona de Alb00129 (Alb11 (L11V, V89T)-A) (SEQ ID NO: 13) y Alb00132 (Alb23 (L5V, L11V, V89T)-A) (SEQ ID NO: 14) y ALB11 (S112K)-A (SEQ ID NO: 15). Preferiblemente, el polipéptido de la
- 30 invención es la SEQ ID NO: 9.
- La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención. También es posible que la composición farmacéutica
- 35 comprenda un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de la invención, un vector o sistema vector que contiene dicho ácido nucleico y/o una célula preferiblemente humana que produce dicho polipéptido de la invención. Opcionalmente, la composición farmacéutica comprende excipientes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 40 Como ejemplos se pueden mencionar, excipientes, desintegradores, aglutinantes, rellenos y lubricantes. Los ejemplos de disgregantes incluyen agar-agar, alginas, carbonato de calcio, celulosa, dióxido de silicio coloidal, gomas, silicato de aluminio y magnesio, metilcelulosa y almidón. Los ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y polivinilpirrolidona. Ejemplos de rellenos incluyen carbonato de calcio,
- 45 fosfato de calcio, sulfato de calcio tribásico, carboximetilcelulosa de calcio, celulosa, dextrina, dextrosa, fructosa, lactitol, lactosa, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, maltitol, maltodextrinas, maltosa, sorbitol, almidón, sacarosa, azúcar y xilitol. Los ejemplos de lubricantes incluyen agar, oleato de etilo, laurato de etilo, glicerina, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, óxido de magnesio, estearatos, manitol, poloxámero,
- 50 glicoles, benzoato de sodio, lauril sulfato de sodio, estearilo de sodio, sorbitol y talco. Los estabilizadores habituales, conservantes, agentes humectantes y emulsionantes, agentes mejoradores de la consistencia, agentes mejoradores del sabor, sales para variar la presión osmótica, sustancias reguladoras, solubilizantes, diluyentes, emolientes, colorantes y

agentes enmascarantes y antioxidantes entran en consideración como adyuvantes farmacéuticos.

5 Los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares.

10 La composición farmacéutica también puede comprender al menos un agente activo adicional, por ejemplo, uno o más anticuerpos adicionales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas.

15 En una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de la invención son para uso en medicina o diagnóstico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son para uso en medicina humana, pero también pueden usarse con fines veterinarios.

20 En particular, el polipéptido de la invención, los ácidos nucleicos, el sistema de vector o vector, el huésped o célula huésped de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención son para uso en el diagnóstico, prevención o tratamiento de trastornos asociado con, causados por o acompañado por niveles elevados y/o actividad de CD40L, y otras enfermedades o afecciones que pueden diagnosticarse, prevenirse o tratarse beneficiosamente inhibiendo y/o neutralizando la actividad de CD40L mediante la administración de un polipéptido de la invención como el descrito anteriormente.

25 En una realización adicional, la presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico, prevención o tratamiento de trastornos asociados con, causados por o acompañados por niveles elevados y/o actividad de CD40L, y otras enfermedades o estados que pueden ser diagnosticados, prevenidos, o tratados inhibiendo y/o neutralizando la actividad de CD40L.

30 En una realización, la presente invención se refiere a un polipéptido de la invención para uso como medicamento.

35 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un polipéptido de la invención para uso en el tratamiento o prevención de un síntoma de una enfermedad autoinmune, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis lúpica, púrpura trombocitopénica inmune (ITP), rechazo de trasplante, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), colitis, asma/alergia, aterosclerosis, miastenia grave, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad coronaria, diabetes tipo 1 y/o respuesta inmune a medicamentos recombinantes, por ejemplo, factor VII en la hemofilia.

40 En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar la prevención de enfermedades o trastornos en un individuo, por ejemplo, en el que está implicada la activación inapropiada de una ruta mediada por CD40L/CD40, comprendiendo el método administrar el polipéptido de la invención a dicho individuo en una cantidad efectiva para  
45 tratar o prevenir un síntoma de dicha enfermedad o trastorno. Las indicaciones médicas preferidas son enfermedades autoinmunes o inflamatorias o afecciones asociadas con niveles elevados y/o actividad de CD40L. La enfermedad o condición puede seleccionarse de, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis lúpica, púrpura trombocitopénica inmune (ITP), rechazo de trasplantes, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria  
50 intestinal (IBD), colitis, asma/alergia, aterosclerosis, miastenia grave, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, enfermedad coronaria, diabetes tipo 1, esclerosis lateral amiotrófica (ALS, también conocida como enfermedad de Lou Gehrig y enfermedad de Charcot) y respuesta inmune a productos

farmacológicos recombinantes, por ejemplo, factor VII en la hemofilia. Las indicaciones particularmente preferidas son ITP, SLE y nefritis lúpica.

5 Un polipéptido de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede administrar a un sujeto que lo necesite en una cantidad eficaz para obtener el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Por ejemplo, un efecto deseado que se logrará mediante dicha administración puede ser bloquear, inhibir y/o neutralizar una o más funciones biológicas de CD40L. En este contexto, la administración puede comprender poner en contacto el polipéptido de la invención con células o un tejido sospechoso de expresar CD40L, preferiblemente a niveles altos y/o aberrantes, en condiciones en las que el polipéptido es capaz de bloquear, inhibir y/o neutralizar la función de CD40L. El contacto puede ser *in vitro* o *in vivo*.

15 La administración de composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, oral, intradérmica, intranasal o intrabronquial. La administración también puede realizarse directamente en el sitio objetivo.

20 El régimen de dosificación será determinado por el médico tratante y los factores clínicos. Como es bien sabido en las artes médicas, la dosificación para un paciente depende de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, el peso, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se administrará, la actividad del polipéptido empleado (incluidos los anticuerpos), el tiempo y la vía de administración, la salud general y la combinación con otras terapias o tratamientos. La materia farmacéuticamente activa proteínica puede estar presente en cantidades entre 1 g y 100 mg/kg de peso corporal por dosis; sin embargo, también se prevén dosis por debajo o por encima de este ejemplo de intervalo. Si el régimen es una infusión continua, puede estar en el intervalo de 1 pg a 100 mg por kilogramo de peso corporal por minuto.

30 Se puede emplear un polipéptido neutralizante de la invención a una concentración de, por ejemplo, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 o 50 pg/mL para inhibir y/o neutralizar una función biológica de CD40L mediante al menos aproximadamente 50%, preferiblemente 75%, más preferiblemente 90%, 95% o hasta 99%, y lo más preferiblemente aproximadamente 100% (esencialmente por completo) según se ensaya por métodos bien conocidos en la técnica.

35 De acuerdo con aspectos adicionales de la invención, el polipéptido de la invención puede usarse en aplicaciones adicionales *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención se pueden emplear para fines de diagnóstico, por ejemplo, en ensayos diseñados para detectar y/o cuantificar la presencia de CD40L y/o para purificar CD40L. Los polipéptidos también se pueden analizar en modelos animales de enfermedades particulares y para llevar a cabo estudios de toxicología, seguridad y dosificación.

40 Finalmente, la invención se refiere a un kit que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la invención, al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica dichos componentes, el vector o sistema vector de la invención, y/o una célula huésped de acuerdo con la invención. Se contempla que el kit se puede ofrecer de diferentes formas, por ejemplo, como un kit de diagnóstico.

45 La invención se puede entender mejor con base en los ejemplos que se presentan a continuación. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos y resultados específicos discutidos son meramente ilustrativos de la invención como se describe en el presente documento.

## 6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos y productos de la invención. Las modificaciones y adaptaciones adecuadas de las condiciones y parámetros descritos normalmente encontrados en la técnica de la biología molecular y celular que son evidentes para los expertos en la técnica están dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

## 6.1 Materiales y métodos

### 6.1.1 Citometría de flujo (unión)

Los extractos periplásmicos se analizaron mediante FACS para unirse a CD40L humana. Se incubaron  $2 \times 10^5$  células (células CHO-K1/humanas estables transfectadas con CD40L) se incubaron con una dilución 1/10 de extractos periplásmicos en regulador FACS (PBS, suero bovino fetal al 10% (Sigma, F7524), azida de sodio al 0,05%) durante 30 minutos a 4°C. Después, las células se lavaron tres veces en regulador FACS y finalmente se resuspendieron en regulador FACS que contenía Phycolink a-FLAG-RPE (Prozyme, PJ315). Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron nuevamente tres veces en regulador FACS y las células muertas se tiñeron con TOPRO3 (Molecular Probes, T3605). Las muestras se analizaron en un FACSarray (BD Biosciences).

### 6.1.2 AlphaScreen (bloqueo)

Con el fin de determinar la capacidad de bloqueo de la interacción CD40L/CD40 de los nanoanticuerpos, los extractos periplásmicos se cribaron en ensayos de competencia basados en proteínas utilizando la tecnología AlphaScreen. En resumen, se capturó CD40L humana biotinilado (HEK, R&D) en las perlas donantes y se capturó una quimera humana CD40-Fc en perlas aceptoras recubiertas con nanoanticuerpo anti-Fc humano. Para evaluar la capacidad de bloqueo de los nanoanticuerpos anti-CD40L, las diluciones de los extractos periplásmicos se incubaron previamente con CD40L biotinilado. A esta mezcla, se añadieron CD40-Fc, perlas aceptoras y perlas donantes acopladas con estreptavidina y se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió usando el lector de placas EnVision Multilabel, usando una longitud de onda de excitación de 680 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La disminución en la señal de AlphaScreen indica que la unión de CD40L biotinilado al receptor de CD40 está bloqueada por el nanoanticuerpo presente en el extracto periplásmico.

### 6.1.3 SPR (velocidades de disociación)

Todas las velocidades de disociación se determinaron en un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se recubrieron Chips sensores ProteOn GLC con 1200 - 1800 RU de CD40L humana recombinante (R&D HEK) en regulador de acetato 10 mM pH 5,5 mediante acoplamiento con amina usando EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) y sulfo-NHS (N-hidroxisuccinimida). Se hicieron pasar extractos periplásmicos diluidos 10 veces de nanoanticuerpos anti-CD40L que expresan clones de *E. coli* en regulador de funcionamiento ProteOn PBS/Tween (solución salina regulada con fosfato, pH 7,4 con Tween 20 al 0,005%) sobre los chips sensores. Los nanoanticuerpos anti-CD40L monovalentes purificados se hicieron pasar sobre los chips sensores a 100 nM. Para maduración por afinidad (véase el Ejemplo 6.8) se llevaron a cabo experimentos a 37°C, todos los demás experimentos se llevaron a cabo a 25°C. Los datos obtenidos se referenciaron dos veces mediante la sustracción de Interspot, así como la sustracción de una inyección de regulador en el blanco. Se usaron curvas procesadas para el análisis de la velocidad de disociación con base en el modelo de disociación de Langmuir.

### 6.1.4 Ensayo Informador

En este ensayo, el efecto de los nanoanticuerpos sobre la inhibición de la señalización de CD40 inducida por CD40L se cuantificó a través de un sistema informador NF-κB-SEAP. Mediante la introducción de un constructo SEAP inducible por NF-κB a través de transfección estable de células HEK293T, la inducción del ligando desencadena la secreción de fosfatasa alcalina embrionaria. El constructo SEAP consiste en el gen informador SEAP bajo el control del promotor mínimo de IFN-β fusionado a cinco sitios de unión a NF-κB (InvivoGen, células TDS HEK-Blue<sup>MR</sup> CD40L, catálogo Hkb-cd40).

La serie de diluciones de nanoanticuerpos se incubaron durante 16 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una cámara húmeda con extractos de membrana de células CHO hCD40L 4B11 y 5 x 10<sup>4</sup> células HEK-Blue en un medio de ensayo (DMEM (Invitrogen, Catálogo 31966-021) + FBS al 10 % (Sigma, Catálogo F7524) + Pen/Step al 1% (Invitrogen, Catálogo 15140-122)). Posteriormente, se añadió una parte de la suspensión al sustrato y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los niveles de SEAP se determinaron usando Envision (620 nm) (Perkin Elmer).

#### 6.1.5 Ensayo de activación de células B

La serie de diluciones de nanoanticuerpos se incubaron durante 5 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una cámara húmeda con 1 x 10<sup>4</sup> células CHO irradiadas hCD40L 4B11 y 5 x 10<sup>4</sup> células B en medio de ensayo (RPMI-1640 (Invitrogen, Catálogo 72400-054) + FBS al 10% (Sigma, Catálogo F7524) + Pen/Step al 1% (Invitrogen, Catálogo 15140-122)). El quinto día la placa se centrifugó durante 5 minutos, 250 g a 4°C. Las células se resuspendieron luego en dilución de anticuerpo (CD19-FITC antihumano de ratón (BD Pharmingen, catálogo: 555412) + CD86-PE antihumano de ratón (BD Pharmingen, catálogo: 555658)) y se colocaron a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con regulador MACS y luego se resuspendieron en regulador MACS que contenía TOPRO3 diluido 1/1000 (Molecular Probes T3605). Las muestras se analizaron en el FACScanto II.

#### 6.1.6 Ensayo de proliferación de células B

La serie de diluciones de nanoanticuerpos se incubaron durante 4 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una cámara húmeda con extractos de membrana de células CHO hCD40L 4B11 y 5 x 10<sup>4</sup> células B en medio de ensayo (RPMI-1640 (Invitrogen, Catálogo 72400-054) + FBS al 10% (Sigma, Catálogo F7524) + Pen/Step al 1% (Invitrogen, Catálogo 15140-122)). El cuarto día, se añadió tritio-timidina (Perkin Elmer, referencia: NET027X001MC) a las placas. Las placas se congelaron después de un período de incubación de 24 horas con tritio-timidina. Al día siguiente, la placa se recogió y analizó en un contador TOP (Perkin Elmer) (ensayo de captación de timidina H<sup>3</sup>).

#### 6.1.7 ELISA de competición

Para evaluar si los nanoanticuerpos reconocieron diferentes epítomos en la proteína CD40L, los nanoanticuerpos purificados se agruparon contra un conjunto más pequeño de nanoanticuerpos presentados en fagos en un ELISA de competición. Cada pozo de una placa de fondo redondo F de 96 pozos Nunc-Immuno<sup>MR</sup> (NUNC) se incubó durante la noche a 4°C con 50 ng de proteína hCD40L (producido en células HEK, R&D, catálogo #: 6420-CL/CF) en PBS. Después de bloquear con leche desnatada al 4% (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron nanoanticuerpos-fago en presencia o ausencia de nanoanticuerpo purificado 0,5 μM. Se detectaron nanoanticuerpos-fagos enlazados con MAb anti-M13-HRP (GE Healthcare; catálogo # 27-9421-01) y se realizó detección colorimétrica a 450 nm con sustrato de tetrametilbenzidina soluble (High Sensitivity) (es (HS) TMB) (SDT)) como sustrato de HRP. La relación entre la absorbancia a 450 nm en presencia y ausencia

de nanoanticuerpo purificado se usó para determinar si los nanoanticuerpos agrupados reconocían los mismos epítomos o epítomos solapantes en la molécula de CD40L.

## 6.2 Identificación de nanoanticuerpos

5

En vista del desencadenamiento de una respuesta inmune contra CD40L en llama, se evaluó la homología a través de diferentes especies calculando el porcentaje de identidad y el número de residuos diferentes de secuencias alineadas de CD40L de diferentes especies, pero considerando únicamente el dominio extracelular. El porcentaje de identidad con CD40L humana varió de 99,5% para el mono rhesus a 88% para llama y menos del 75% para ratón y rata. La alta homología de CD40L humana (hCD40L) con llama CD40L confunde la generación de anticuerpos. La baja homología de CD40L humana con CD40L de rata y ratón complica el hallazgo de nanoanticuerpos de reactividad cruzada.

10

15

Cinco llamas exogámicas fueron inmunizadas. Se inmunizaron dos llamas con CD40L humana recombinante (PeproTech, 310-02). Se inmunizaron tres llamas con células de llama que expresan hCD40L. A pesar de la alta homología entre hCD40L y CD40L de llama, todas las llamas mostraron una fuerte respuesta inmune contra hCD40L.

20

Se generaron bibliotecas de presentación en fagos de nanoanticuerpo inmune a partir de ADNc preparado usando ARN total extraído de muestras de sangre de todas las llamas. Las bibliotecas de presentación en fagos se sondearon usando ya sea CD40L humana recombinante, CD40L humana expresada en células humanas o ambos formatos de antígeno alternando entre ciclos de selección.

25

Los resultados de la selección se cribaron para la unión de nanoanticuerpos a través de FACS y para el bloqueo en un ensayo de competición AlphaScreen de acuerdo con los Ejemplos 6.1.1 y 6.1.2 anteriores.

30

Después de una ronda de selección, aproximadamente el 50% de los Nanoanticuerpos de unión también bloqueaban la interacción CD40L/CD40. El número de aglutinantes FACS y la fracción de nanoanticuerpos bloqueantes aumentó con rondas de selección, excepto por los nanoanticuerpos seleccionados en hCD40L recombinante producidos en *E. coli*. Se observaron tasas de aciertos mayores para los clones que se originaron en animales inmunizados con células CHO-CD40L.

35

Más de 1500 aciertos de nanoanticuerpos que cumplían con los criterios de corte en FACS y AlphaScreen se secuenciaron posteriormente, lo que resultó en 689 clones únicos que pertenecen a 210 familias diferentes de nanoanticuerpos. Las velocidades de disociación de estos clones se determinaron como se expone en el Ejemplo 6.1.3.

40

Se seleccionaron 40 clones diferentes de nanoanticuerpo para caracterización adicional, es decir, el panel principal. Solo se consideraron los clones que bloquearon la interacción CD40/CD40L en AlphaScreen®, que se unieron a la conformación nativa de CD40L (FACS) y que tenían una velocidad de disociación  $< 4 \times 10^{-3}$ .

45

## 6.3 Caracterización *in vitro* del panel principal de 40 nanoanticuerpos

50

Los 40 nanoanticuerpos del panel principal se clonaron en pAX205, producidos en *P. pastoris* y se purificaron para su posterior caracterización. Sus potencias se determinaron a través de AlphaScreen y en ensayos informadores y de activación de células B (véanse los Ejemplos 6.1.4 y 6.1.5). Además, se confirmaron las velocidades de disociación. Los compartimientos de epítomos se determinaron mediante el cribado de nanoanticuerpos

purificados frente a nanoanticuerpos presentados en fagos en un ELISA de competición (véase el Ejemplo 6.1.7).

5 Se identificaron 7 compartimientos de epítomos diferentes dentro del panel principal de 40 nanoanticuerpos. Los nanoanticuerpos C0100028B02 (compartimiento 6.2) y C0100046B03 (compartimiento 2.1) están en diferentes compartimientos de epítomos que CDP7657 (compartimiento 1.1). Los clones más potentes pertenecían al compartimiento del epítomo 6.2

10 En vista de la conservación de la secuencia entre CD40L humana y de llama, no se esperaba que se identificaran nanoanticuerpos pertenecientes a 7 diferentes compartimientos de epítomos.

#### 6.4 Selección adicional *in vitro* del panel principal de 15 nanoanticuerpos

15 Un fenotipo importante que es inducido por la interacción CD40L-CD40 es la activación y proliferación de las células B. Las células B pueden presentar antígenos a las células T auxiliares. Si una célula T activada reconoce al péptido presentado por la célula B, CD40L en la célula T se une a la célula B, su receptor CD40, provocando la activación de la célula B en reposo. La célula T también produce IL-4, que influye directamente en las células B. Como resultado de estas estimulaciones, las células B pueden experimentar división.

20 Se analizaron 15 nanoanticuerpos, seleccionados con base en la diversidad de secuencia y su rendimiento en el ensayo de activación de células B, en un ensayo de proliferación de células B de acuerdo con el Ejemplo 6.1.6. La principal diferencia entre el ensayo de activación y proliferación de células B es la lectura (determinación de niveles de CD86 y absorción de timidina H<sup>3</sup>, respectivamente) y la fuente de CD40L utilizada para activar las células B (células CHO irradiadas con UV que expresan hCD40L y extractos de membrana de células hCD40L, respectivamente). Para ambos ensayos, las células B se originaron de donantes sanos. La captación de timidina H<sup>3</sup> es un indicador posterior adicional de la activación de células B diferente a la expresión de CD86 y, por lo tanto, se considera la lectura funcional más relevante. En el ensayo de proliferación de células B, se encontró que 6 de los 15 clones tenían potencias comparables a Fab CDP7657.

#### 35 6.5 Selección de 4 candidatos principales

40 Con base en el ensayo informador AlphaScreen, el ensayo de activación de células B y el ensayo de proliferación de células B como se expuso anteriormente y los datos de estabilidad fisicoquímica (datos no mostrados), el panel principal se redujo a 4 candidatos principales para la etapa de caracterización final. A partir del compartimiento del epítomo más potente (compartimiento 6.2, véase más arriba), se seleccionaron dos candidatos principales de diferentes familias: C0100028B02 ("28B02") y C0100044B07 ("44B07"). Aunque C0100028B02 fue uno de los mejores clones en el ensayo de proliferación de células B, C0100044B07 fue el clon más potente en el ensayo de activación de células B y un clon muy potente en el ensayo de proliferación de células B. Se seleccionaron dos candidatos principales adicionales. C0100029C10 ("29C10") del compartimiento del epítomo 4.2, que era también un clon potente en el ensayo de proliferación de células B. A pesar de los criterios anteriores, que indican que al menos 9 clones se comportaron mejor en diversos ensayos, los presentes inventores decidieron seleccionar también C0100046B03 ("46B03") del compartimiento del epítomo 2.1, ya que representaba una línea germinal diferente.

#### 6.6 Formateo: efecto de la extensión de la semivida (HLE)

El tratamiento de enfermedades autoinmunes típicamente requiere que los fármacos tengan una disponibilidad sostenida en el paciente, es decir, que el fármaco debe tener una semivida larga. Se encuentran disponibles diversos medios de extensión de semivida de los fármacos, que incluyen fusiones de Fc, PEGilación y fusión a albúmina de suero y ligantes de albúmina.

Se formuló la hipótesis de que la fusión de Fc es la opción menos preferida, ya que esto permitiría la unión a los receptores de Fc presentes en las plaquetas humanas, dando como resultado potencialmente la activación y agregación de plaquetas. Además, no se prefiere la PEGilación ya que la fracción PEG se conjuga con el nanoanticuerpo en una etapa de producción separada, dando como resultado un aumento de los costos y una disminución de los rendimientos. Además, la PEGilación a menudo conduce a una afinidad de unión reducida debido a la interferencia estérica con la interacción de unión fármaco-objetivo y adolece de PEA elevadas. En vista de esto, se optó por la extensión de semivida por fusión a una albúmina de suero de unión a ISVD.

Con el fin de evaluar la influencia de la unión de la albúmina en los candidatos principales, se construyeron y probaron ISVD monovalentes de semivida extendida (HLE) (NB-35GS-Alb11-FLAG3-HIS6) y sin HLE en el ensayo de proliferación de células B en presencia y ausencia de albúmina de suero humano (HSA) como se indica por IC<sub>50</sub>:

- C010000006 es C01000028B02-Alb11-FLAG3-HIS6;
- C010000008 es C01000029C10-Alb11-FLAG3-HIS6;
- C010000004 es C01000044B07-Alb11-FLAG3-HIS6; y
- C010000010 es C01000046B03-Alb11-FLAG3-HIS6.

Los resultados se muestran en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6: Influencia de la fusión de extensión de semivida de ISVD y unión de HSA en la potencia de los nanoanticuerpos principales en el ensayo de proliferación de células B

| Constructo                | IC <sub>50</sub> (M) |                      | Diferencia de veces |      |
|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------|
|                           | -HSA                 | +HSA                 | -HSA                | +HSA |
| C010000006<br>C0100028B02 | 5,97E-10             | 1,33E-09<br>2,81E-09 | 1                   | 2,2  |
| C010000008<br>C0100029C10 | 1,26E-09             | 2,06E-09<br>1,06E-09 | 1                   | 1,6  |
| C010000004<br>C0100044B07 | 1,18E-09             | 1,88E-09<br>1,14E-09 | 1                   | 1,6  |
| C010000010<br>C0100046B03 | 8,52E-10             | 1,72E-09<br>2,38E-09 | 1                   | 2    |

Solo se observaron pequeñas diferencias en la potencia, lo que indica un impacto limitado de la extensión de la semivida sobre las potencias de las moléculas. A diferencia de CDP7657 para el que la extensión de semivida de la fracción Fab' mediante PEGilación disminuyó la actividad en 4-5 veces (véase el documento US2010/0104573).

## 6.7 Reactividad cruzada de especies y selectividad

### 6.7.1 Reactividad cruzada de las especies

Considerando diferentes grados de homología de secuencia de CD40L con CD40L humana, que varía desde 99.5% para mono rhesus a menos de 75% para ratón y rata, se evaluó la reactividad cruzada de especies con CD40L de ratón, rata, cynomolgus y mono rhesus.

5 Para evaluar la unión a CD40L de ratón (número de acceso de UniProt: P27548), se recubrieron chips sensores de GLC ProteOn con 3000 - 4000 RU de CD40L recombinante de ratón (NS0 de R&D) en regulador de acetato 10 mM, pH 5,5. Nanoanticuerpos anti-CD40L monovalentes purificados en regulador de operación de ProteOn: PBS/Tween (solución salina regulada con fosfato, pH 7,4 con Tween 20 al 0,005%) se pasaron sobre los chips sensores a 100 nM. Se usaron curvas procesadas para el análisis de velocidad de disociación con base en el modelo de disociación de Langmuir. Se probaron los 40 clones del panel principal. Sin embargo, ninguno de ellos mostró unión a CD40L de ratón.

15 Se ensayó la reactividad cruzada con CD40L de rata (números de acceso de UniProt: Q9Z2V2 y Q9R254 (secundario)) en FACS. Los Nanoanticuerpos purificados se analizaron en FACS para la unión a CD40L de rata. Se incubaron  $2 \times 10^5$  células (células HEK CD40L de rata transfectadas transitoriamente) con los nanoanticuerpos purificados en regulador FACS durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron 3 veces, se resuspendieron y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron nuevamente 3 veces y las células muertas se tiñeron con TOPRO3 (Molecular Probes, T3605). Las muestras se analizaron en un FACSarray<sup>MR</sup> (BD Biosciences). Solo se analizaron los cuatro candidatos principales finales (C0100028B02, C0100029C10, C0100044B07 y C0100046B03). No se observó unión para ninguno de los nanoanticuerpos.

25 Se ensayó la reactividad cruzada con CD40L de cynomolgus (número de acceso de UniProt: G7PG38) y CD40L de rhesus (número de acceso de UniProt: G7N4M5) en un ensayo de competición por ligandos. Los nanoanticuerpos purificados se analizaron en FACS para competición con la unión de CD40L humana biotinilado que se une a células que expresan CD40 de humano/rhesus/cynomolgus. Se usó CD40L humana ya que las formas solubles de CD40L de humano, rhesus y cynomolgus (cyno) son idénticas en secuencia. Se incubaron  $2 \times 10^5$  células (células HEK transfectadas transitoriamente) con diluciones seriadas de los nanoanticuerpos purificados en regulador FACS durante 30 minutos a 4°C. Después, las células se lavaron 3 veces y finalmente se resuspendieron en regulador FACS que contenía estreptavidina-PE (BD Pharmingen, No. 554061). Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C. Las células se manejaron adicionalmente como se estableció anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 6.7.

Tabla 6.7: reactividad cruzada humana/cyno/rhesus (competición por ligando)

| Construc <sup>to</sup> | CD40 humano          |                         | CD40 de cyno         |           | CD40 de rhesus       |           |
|------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|
|                        | IC <sub>50</sub> (M) | % bloqueo <sup>2*</sup> | IC <sub>50</sub> (M) | % bloqueo | IC <sub>50</sub> (M) | % bloqueo |
| C0100028B02            | 4,43E-09             | 71                      | 4,70E-09             | 75        | 4,55E-09             | 72        |
| C0100029C10            | 1,42E-10*            | 98                      | 8,07E-09             | 81        | 1,24E-08             | 87        |
| C0100044B07            | 5,89E-09             | 82                      | 5,28E-09             | 79        | 5,41E-09             | 83        |
| C0100046B03            | 1,53E-08             | 96                      | 2,27E-08             | 97        | 2,82E-08             | 100       |

40 \* ajuste de la curva por debajo del nivel óptimo; 2\* efecto máximo observado

Para cada uno de los nanoanticuerpos, los valores de IC<sub>50</sub> fueron idénticos dentro del error experimental para las diferentes especies de CD40L.

## 45 6.7.2 Selectividad

La utilizó la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) para identificar la proteína relacionada más cercana en la base de datos de proteína humana. Las proteínas relacionadas más cercanas (variantes diferentes a CD40L) fueron TNF $\alpha$ , HVEM-L (TNF14) y RANKL (TNF11) con una identidad de secuencia de 27,9%, 27,9% y 25,4%, respectivamente. Para evaluar la selectividad para CD40L, se recubrieron placas MaxiSorp (Nunc, 430341) durante la noche con CD40L humana (4°C) seguido por una hora de bloqueo (PBS, caseína al 1%) a temperatura ambiente. Se usó una concentración fija de nanoanticuerpo junto con una dilución serial del competidor (TNF $\alpha$ , HVEM-L (TNF14) y hRANKL (TNF11), se usó CD40L como control positivo), comenzando con un exceso de 100 veces. Los nanoanticuerpos se detectaron con anti-FLAG-HRP (Sigma (A8592)).

No se observó unión hacia el TNF $\alpha$  humano, HVEM-L (TNF14) y hRANKL (TNF11) para ninguno de C0100028B02, C0100029C10, C0100044B07 y C0100046B03.

## 6.8 Maduración por afinidad

Los cuatro nanoanticuerpos seleccionados (C0100028B02, C0100029C10, C0100044B07 y C0100046B03) tenían potencias en un intervalo nanomolar en el ensayo de proliferación de células B, según lo indicado por la  $IC_{50}$  (véase la Tabla 6.8).

Tabla 6.8: Resumen de los datos de potencia de los 4 nanoanticuerpos principales en el ensayo de proliferación de células B

| Nanoanticuerpo | $IC_{50}$ promedio (M) | Desviación estándar $IC_{50}$ (M) |
|----------------|------------------------|-----------------------------------|
| C0100028B0     | 1,15E-09               | 5,05E-10                          |
| C0100029C10    | 1,26E-09               | 6,58E-10                          |
| C0100044B07    | 9,71E-10               | 2,48E-10                          |
| C0100046B0     | 2,18E-09               | 1,09E-09                          |

Con el fin de aumentar aún más la potencia, los nanoanticuerpos fueron madurados por afinidad. Para el cribado de las variantes de maduración por afinidad de los nanoanticuerpos parentales, se determinaron las velocidades de disociación.

La maduración por afinidad se realizó mediante el cribado de bibliotecas propensas a errores generadas a partir de cada clon de nanoanticuerpo parental. En este enfoque, las sustituciones de aminoácidos resultan de la introducción aleatoria de mutaciones en el ADN que codifica nanoanticuerpos a través de una PCR propensa a error. Como consecuencia, las sustituciones de aminoácidos se encuentran tanto en las CDR como en las regiones marco (FR). Se realizaron 5 rondas de selecciones de presentación en fago en solución usando concentraciones decrecientes de CD40L recombinante (de 50 nM a 0,05 pM). Después de la presentación en fago, se secuenciaron nanoanticuerpos individuales y se determinaron las velocidades de disociación mediante análisis SPR (véase el Ejemplo 6.1.3). Con base en los datos de velocidad de disociación, las mutaciones con un efecto beneficioso se investigaron adicionalmente.

### 6.8.1 C0100028B02 (28B02)

Se obtuvieron 413 secuencias después de la selección, de las cuales 294 clones no fueron redundantes con base en la secuenciación. De estos clones únicos, las velocidades de disociación de 271 clones se analizaron en ProteOn.

esencia, las mutaciones en marco (hasta 6 en un clon), que se dispersaron por todos los nanoanticuerpos, no afectaron o afectaron mínimamente a las velocidades de disociación (datos no mostrados). Ninguna de las mutaciones en FR se retuvo. Las mutaciones de CDR se muestran en las tablas a continuación.

5

Aproximadamente el 25% de los clones mostraron una velocidad de disociación mejorada hasta 2 veces sobre el nanoanticuerpo parental.

| 28B02                       | CDR1* |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------------------------|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| numeración de Kabat         | 26    | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 |
| numeración absoluta         | 1     | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
| secuencia de tipo silvestre | G     | F  | T  | L  | E  | Y  | Y  | A  | I  | G  |
| mutaciones                  |       |    | S  | Q  |    |    |    | N  | L  | A  |
| mutaciones                  |       |    | N  | S  |    |    |    | V  | V  |    |
| mutaciones                  |       |    | A  | M  |    |    |    |    |    |    |
| mutaciones                  |       |    | I  | G  |    |    |    |    |    |    |

\* Hasta 2 mutaciones de CDR1 en un clon

10

| 28B02                       | CDR2* |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------------------------|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| numeración de Kabat         | 50    | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 |
| numeración absoluta         | 1     | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  |
| secuencia de tipo silvestre | C     | I  | S  | S  | E  | G  | S  | T  | S  |
| mutaciones                  | .     | V  | G  | .  | G  | S  | G  | A  | I  |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .  | N  | P  | R  |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .  | T  | I  | G  |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .  | I  | S  | .  |

15

20

\* Hasta 2 mutaciones de CDR2 en un clon

| 28B02                       | CDR3* |    |    |    |    |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |
|-----------------------------|-------|----|----|----|----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| numeración de Kabat         | 95    | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100a | 100b | 100c | 100d | 100e | 100f | 100g | 100h | 100i | 100j | 100k | 100l | 101 | 102 |
| numeración absoluta         | 1     | 2  | 3  | 4  | 5  | 6   | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19  | 20  |
| secuencia de tipo silvestre | D     | P  | D  | R  | G  | F   | L    | G    | S    | S    | C    | D    | T    | Q    | S    | H    | Q    | Y    | D   | Y   |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | S  | .  | .   | F    | D    | G    | N    | .    | G    | N    | H    | P    | N    | L    | F    | G   | F   |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .   | M    | A    | N    | G    | .    | N    | A    | K    | T    | Y    | R    | .    | .   | N   |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .   | W    | S    | R    | R    | .    | E    | .    | L    | .    | .    | H    | .    | .   | .   |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .   | .    | .    | .    | T    | .    | V    | .    | R    | .    | .    | .    | .    | .   | .   |

\* Hasta 3 mutaciones de CDR en un clon

25

Se seleccionaron 3 mutaciones en CDR3 para investigación adicional con base en este conjunto de datos:

L100aF: esta mutación dio como resultado una velocidad de disociación mejorada de 1,3 veces (preferiblemente en combinación con K43R);

D101G: esta mutación resultó en una mejora de 1,3 veces en la velocidad de disociación; y

30

Y102F: esta mutación produjo una mejora de 1.8 veces en la velocidad de disociación.

La variante final fue C010002366 (SEQ ID NO: 7).

#### 6.8.2 C0100046B03 (46B03)

Se obtuvieron 731 secuencias de las cuales 229 clones fueron no redundantes. Todos los 229 clones fueron analizados en el ProteOn.

5 En esencia, las mutaciones en marco (hasta 6 en un clon), que se dispersaron por todos los nanoanticuerpos, no afectaron o afectaron mínimamente a la velocidad de disociación (datos no mostrados). Ninguna de las mutaciones en FR se retuvo. Las mutaciones de CDR se muestran en las tablas a continuación.

10

| 46B03                       | CDR1* |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------------------------|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| numeración de Kabat         | 26    | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 |
| numeración absoluta         | 1     | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
| secuencia de tipo silvestre | G     | R  | T  | P  | L  | N  | Y  | H  | M  | A  |
| mutaciones                  | E     | H  | I  | S  | F  | S  | H  | N  | K  | S  |
| mutaciones                  | R     | G  | A  | .  | .  | D  | .  | .  | T  | G  |
| mutaciones                  | .     | .  | S  | .  | .  | I  | .  | .  | V  | T  |
| mutaciones                  | .     | .  | P  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  |

\* Hasta 2 mutaciones de CDR1 en un clon

| 46B03                       | CDR2* |    |    |     |    |    |    |    |    |    |
|-----------------------------|-------|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|
| numeración de Kabat         | 50    | 51 | 52 | 52a | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 |
| numeración absoluta         | 1     | 2  | 3  | 4   | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
| secuencia de tipo silvestre | A     | I  | S  | S   | L  | L  | G  | S  | T  | D  |
| mutaciones                  | G     | V  | .  | N   | .  | I  | S  | I  | P  | .  |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | R   | .  | .  | D  | G  | S  | .  |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | G   | .  | .  | .  | F  | .  | .  |

\* Hasta 2 mutaciones de CDR1 en un clon

| 46B03                       | CDR3* |    |    |    |    |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |
|-----------------------------|-------|----|----|----|----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| numeración de Kabat         | 95    | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 100a | 100b | 100c | 100d | 100e | 100f | 100g | 100h | 100i | 100j | 100k | 100l | 101 | 102 |
| numeración absoluta         | 1     | 2  | 3  | 4  | 5  | 6   | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19  | 20  |
| secuencia de tipo silvestre | R     | E  | T  | T  | H  | Y   | S    | T    | S    | D    | R    | V    | N    | E    | M    | R    | H    | Y    | D   | Y   |
| mutaciones                  | Q     | D  | S  | I  | Y  | H   | T    | I    | N    | A    | S    | .    | D    | V    | V    | K    | N    | .    | N   | H   |
| mutaciones                  | L     | K  | M  | S  | N  | N   | G    | A    | R    | .    | G    | .    | Y    | A    | K    | S    | L    | .    | .   | F   |
| mutaciones                  | .     | .  | A  | A  | .  | .   | N    | .    | .    | .    | .    | .    | S    | D    | T    | W    | Q    | .    | .   | N   |
| mutaciones                  | .     | .  | K  | R  | .  | .   | I    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | N    | .    | M    | R    | .    | .   | .   |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | G    | D    | .    | .   | .   |
| mutaciones                  | .     | .  | .  | .  | .  | .   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | T    | .    | .    | .   | .   |

15 \* Hasta 4 mutaciones de CDR3 en un clon

Aproximadamente el 25% de los clones mostraron una velocidad de disociación mejorada hasta 5,2 veces sobre la del nanoanticuerpo parental. Se seleccionaron 6 posiciones para una investigación adicional con base en este conjunto de datos:

20

- Y100H: no tiene efecto en la velocidad de disociación
- Y100I: velocidad de disociación mejorada 1,5 veces

- S100aT: no tiene efecto en la velocidad de disociación
  - N100gD: efecto no pronunciado
  - E100hV: no tiene efecto en la velocidad de disociación
  - M100il: no tiene efecto en la velocidad de disociación
  - 5 • H100kN: velocidad de disociación mejorada 2,6 veces con una sola mutación
  - H100kA: velocidad de disociación mejorada aproximadamente 2 veces
  - H100kS: velocidad de disociación mejorada aproximadamente 2 veces
- La variante final fue C010003290 (SEQ ID NO: 8).

## 10 6.9 variantes de Alb

En la investigación que conduce a la presente invención, se descubrió que la adición de una extensión C-terminal a la región C-terminal de un nanoanticuerpo evita esencialmente la unión de anticuerpos preexistentes en la gran mayoría de las muestras de plasma/suero de sujetos humanos sanos (véase más adelante). Sin embargo, la sangre y el suero de una serie de sujetos humanos que padecen ciertos trastornos graves (auto) inmune, incluido el SLE, parecen contener algunos anticuerpos/factores preexistentes que pueden unirse a nanoanticuerpos incluso cuando dichos nanoanticuerpos comprenden una extensión C-terminal.

En los ejemplos a continuación, la unión de anticuerpos preexistentes que están presentes en las muestras utilizadas (es decir, de voluntarios sanos y pacientes con SLE) con los nanoanticuerpos probados se determinó usando ProteOn de la siguiente manera: la unión de anticuerpos preexistentes en nanoanticuerpos capturados en albúmina de suero humano (HSA) se evaluó usando ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se usó PBS/Tween (solución salina regulada con fosfato, pH 7,4, Tween20 al 0,005%) como regulador de operación y los experimentos se realizaron a 25°C. Los carriles del ligando de un chip sensor ProteOn GLC se activaron con EDC/NHS (velocidad de flujo 30 µL/min) y se inyectó HSA a razón de 10 µg/mL en regulador acetato de ProteOn pH4,5 (velocidad de flujo 100 µL/min) para rendir niveles de inmovilización de aproximadamente 3200 RU. Después de la inmovilización, las superficies se desactivaron con clorhidrato de etanolamina (velocidad de flujo 30 µL/min). Los nanoanticuerpos se inyectaron durante 2 minutos a razón de 45 µL/min sobre la superficie de HSA para producir un nivel de captura de nanoanticuerpos de aproximadamente 200 RU. Las muestras que contenían anticuerpos preexistentes se centrifugaron durante 2 minutos a 14.000 rpm y el sobrenadante se diluyó 1:10 en PBS-Tween20 (0,005%) antes de inyectarse durante 2 minutos a razón de 45 µL/min seguido de una etapa de disociación posterior de 400 segundos. Después de cada ciclo (es decir, antes de una nueva etapa de captura de nanoanticuerpo y etapa de inyección de la muestra de sangre), las superficies de HSA se regeneraron con una inyección durante 2 minutos de HCl (100 mM) a razón de 45 µL/min. El procesamiento del sensograma y el análisis de datos se realizaron con ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los sensogramas que muestran la unión de anticuerpos preexistentes se obtuvieron después de referenciación doble restando 1) disociación de nanoanticuerpos-HSA y 2) unión no específica al carril del ligando de referencia. Los niveles de unión de los anticuerpos preexistentes se determinaron estableciendo puntos de informe a los 125 segundos (5 segundos después del final de la asociación). El porcentaje de reducción en la unión de anticuerpos preexistentes se calculó con relación a los niveles de unión a 125 segundos de un nanoanticuerpo de referencia. Referencia A = Alb8 (SEQ ID NO: 16); Referencia B = Alb8 + A (SEQ ID NO: 17) (véase la Tabla 2).

6.9.1: Influencia de la mutación S112K en la unión de anticuerpos preexistentes que están presentes en muestras humanas de SLE

La Referencia A y la referencia B se probaron para la unión de anticuerpos preexistentes a partir de 7 muestras de suero obtenidas de pacientes que se confirmaron positivos para SLE. Para comparación, se incluyeron muestras de plasma de dos voluntarios humanos sanos.

5

La unión de anticuerpos preexistentes en las muestras analizadas a los nanoanticuerpos se midió en ProteOn de acuerdo con el protocolo general descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 6.9.1 a continuación.

10

Como puede observarse a partir de una comparación de los datos de unión para la Referencia A y la Referencia B y nanoanticuerpos de la invención, las muestras obtenidas de algunos de los pacientes con SLE parecen contener ciertos anticuerpos preexistentes que aún pueden unirse a nanoanticuerpos incluso en presencia de un residuo de alanina C-terminal (el residuo de alanina C-terminal esencialmente evitó/eliminó (parcial o esencialmente completamente) toda la unión de los anticuerpos preexistentes que estaban presentes en las muestras de plasma de voluntarios sanos).

15

Se puede ver además que la unión de estos anticuerpos preexistentes de muestras de SLE podría reducirse en gran medida mediante mutaciones en las posiciones 11 y 112 (y en el caso de la posición 112, en particular mediante S112K).

20

6.9.2: Influencia de mutaciones marco combinadas y extensión C-terminal sobre la unión de anticuerpos preexistentes que están presentes en muestras humanas de SLE

25

Se analizaron cuatro nanoanticuerpos diferentes (con mutaciones estructurales específicas y con o sin extensión de alanina C-terminal) para la unión de anticuerpos preexistentes a partir de 5 muestras de suero obtenidas de pacientes que se confirmaron positivos para SLE. Para comparación, se incluyó una muestra de plasma de un voluntario humano saludable.

30

La unión de anticuerpos preexistentes en las muestras a los nanoanticuerpos probados se midió en ProteOn de acuerdo con el protocolo general descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las Tablas 6.9.2 (a) y 6.9.2 (b) a continuación.

35

Como puede observarse a partir de una comparación de los datos de unión para la Referencia A y la Referencia B, las muestras obtenidas de pacientes con SLE parecen contener ciertos anticuerpos preexistentes que aún pueden unirse a nanoanticuerpos incluso en presencia de un residuo de alanina C-terminal. El residuo de alanina C-terminal esencialmente evitó/eliminó toda la unión de los anticuerpos preexistentes que estaban presentes en las muestras de plasma del voluntario sano.

40

Se puede ver además que la unión de estos anticuerpos preexistentes de muestras de SLE podría reducirse en gran medida mediante mutaciones en las posiciones 11 y 112 (y en el caso de la posición 112, en particular mediante S112K).

45

6.9.3: Influencia de una mutación V89T en la unión de anticuerpos preexistentes en muestras de pacientes con SLE.

50

Como se describe en este documento, las muestras obtenidas de ciertos pacientes con SLE parecen contener anticuerpos/factores preexistentes que pueden unirse al extremo C-terminal expuesto de un dominio VH, incluso cuando está presente una extensión C-terminal. Se investigó si una mutación V89T podría reducir o prevenir/eliminar dicha unión, con o sin la presencia de una extensión C-terminal. Los resultados también se muestran en las Tablas 6.9.2 (b) y 6.9.3 (a) a continuación.

Como puede observarse, una mutación V89T podría esencialmente prevenir/eliminar la unión de anticuerpos preexistentes que están presentes en muestras obtenidas de pacientes con SLE, en un grado similar al de una mutación S112K. Sin embargo, como se puede ver al comparar los datos dados en las Tablas 6.9.2 (b) y 6.9.3 (a) para nanoanticuerpos con una mutación V89T y sin una extensión C-terminal con nanoanticuerpos similares con una mutación S112K y sin una extensión de C-terminal, que tiene una mutación en la posición 112 en un nanocuerpo sin una extensión C-terminal generalmente reduce la unión de anticuerpos preexistentes en muestras de un voluntario sano en un grado mayor que una mutación V89T (es decir, 100%, 85% y 64% de nanoanticuerpos S112K frente a 9%, 11% y 16% para nanoanticuerpos V89T, respectivamente). Por esta razón, con frecuencia se preferirá el uso de una mutación en la posición 112 (y en particular S112K o S112Q) sobre el uso de una mutación en la posición 89 (como V89T).

Sin embargo, como también se puede ver a partir de los datos de las Tablas 6.9.2 (b) y 6.9.3 (a), agregar una alanina C-terminal a un nanocuerpo V89T previno/eliminó completamente la unión de anticuerpos preexistentes en una muestra obtenida de voluntarios sanos, y por esta razón, generalmente se preferirá una combinación de una mutación V89T y una extensión C-terminal como se describe en este documento (es decir, sobre el uso de un V89T sin extensión C-terminal) si el nanoanticuerpo V89T o el dominio VH tiene, o se pretende que tenga, una región C-terminal expuesta en la proteína o polipéptido en la que estará presente (por ejemplo, porque forma el extremo C-terminal de la misma).

Para confirmar que los resultados/hallazgos de la tabla anterior son ampliamente aplicables, se probaron nanoanticuerpos representativos con mutaciones S112K y/o V89T frente a un panel de prueba de 96 muestras de suero humano (S112K) y 129 (V89T). La unión se determinó en ProteOn usando el protocolo expuesto anteriormente.

Los resultados se resumen en la Figura 1 y la Tabla 6.9.3 (b) (nanoanticuerpo representativo con una mutación S112K). En la Figura 1, se comparó un nanoanticuerpo con una mutación S112K (Referencia A + S112K + alanina C-terminal - véase la Tabla 6.9.2 (b) anterior) con un nanoanticuerpo de referencia (Referencia A; SEQ ID NO: 16). El nanoanticuerpo con la mutación S112K y la Referencia A se probaron contra cada una de las muestras de suero, y se determinó el nivel de unión a 125 segundos (RU). Los datos se graficaron luego en la Figura 1, con cada punto presentando la unión medida en una muestra para la Referencia A (indicada como (1) en la Figura 1) o para el mutante S112K (indicado como (2) en la Figura 1). La línea punteada indica un nivel de unión medido de 20 RU.

Los mismos datos también se representan numéricamente en la Tabla 6.9.3 (b), que menciona, para la Referencia A y el mutante S112K, respectivamente, el número total de muestras analizadas que produjeron un nivel de unión a 125 segundos de más de 20 RU, menos de 20 RU (es decir, entre 0 y 20 RU) y menos de 10 RU.

Como puede observarse a partir de los datos representados en la Figura 1 y mostrados en la Tabla 6.9.3 (b), para la Referencia A, más de la mitad de las 96 muestras analizadas produjeron un nivel de unión de más de 20 RU (en algunos casos, tan alto como 150-200 RU), lo que indica que los anticuerpos preexistentes presentes en la muestra se unieron a la Referencia A. En comparación, para el mutante S112K, ninguna muestra produjo un nivel de unión de más de 20 RU (y la mayoría menos de 10 RU), lo que indica que la mutación S112K era esencialmente capaz de reducir/prevenir la unión de los anticuerpos preexistentes en todas las 96 muestras analizadas.

Una gráfica similar y datos similares se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 6.9.3 (c), respectivamente, para un nanoanticuerpo representativo con una mutación V89T (Referencia A + L11V + V89T + alanina C-terminal; véase la Tabla 6.9.3 (a) más arriba),

probado frente a 129 muestras de suero y nuevamente comparado con la Referencia A (indicada por (1) en la Figura 2, el mutante V89T está indicado por (2) en la Figura 2). Nuevamente, a partir de la gráfica en la Figura 2 y los datos en la Tabla 6.9.3 (c), se puede observar que con algunas excepciones (es decir, menos del 10% de las muestras analizadas, cada una de las cuales produjo un valor absoluto de unión después de 125 segundos de aproximadamente 100 RU o menos), la mutación V89T fue capaz de reducir/prevenir la unión de los anticuerpos preexistentes en la mayoría de las 129 muestras analizadas, mientras que la referencia sin la mutación V89T estaba unida a anticuerpos preexistentes en la mayoría de los muestras probadas.

Tabla 6.9.3 (b): prueba de nanoanticuerpo representativo con mutación S112K contra 96 muestras de suero.

| Nanoanticuerpo probado                    | Nivel de unión a 125 segundos < 10 RU | Nivel de unión a 125 segundos < 20 RU | Nivel de unión a 125 segundos > 20 RU |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Referencia A                              | 34                                    | 41                                    | 55                                    |
| Referencia A + S112K + alanina C-terminal | 92                                    | 96                                    | 0                                     |

Tabla 6.9.3 (c): prueba de mutantes de nanoanticuerpo con mutaciones V89L y/o T100K/Q contra 129 muestras de suero.

| Nanoanticuerpo probado                          | Nivel de unión a 125 segundos < 10 RU | Nivel de unión a 125 segundos < 20 RU | Nivel de unión a 125 segundos > 20 RU |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Referencia A                                    | 27                                    | 40                                    | 89                                    |
| Referencia A + L11V + V89T + alanina C-terminal | 110                                   | 119                                   | 10                                    |

## 6.10 Formato final

Con base en los datos de optimización de variantes de Alb para reducir la unión de anticuerpos preexistentes (véase el Ejemplo 6.9), los ISVD que se unen a CD40L se fusionan a variantes de Alb optimizadas y se probaron adicionalmente.

### 6.10.1 Unión de anticuerpos preexistentes en el formato final.

C0100028B02 y C0100046B03 se fusionaron tanto a una variante Alb11 como a una Alb23, es decir, Alb00129 (Alb11(L11V,V89T)-A) y Alb00132 (Alb23(L5V,L11V,V89T)-A), respectivamente (véase la Tabla 6.10).

Tabla 6.10: cables extendidos HLE

| ID de la Nanobase | Descripción                                                                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C010003320        | C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-Alb11(L11V,V89T)-A                                             |
| C010003323        | C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-Alb23(L5V,L11V,V89T)-A                                         |
| C010003326        | C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-ALB11(S112K)-A                                                 |
| C010003313        | C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100il,H100kN)-9GS-Alb11(L11V,V89T)-A |

|                |                                                                                                               |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C01000331<br>5 | C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100il,H100kN)-9GS-Alb23(L5V,L11V,V89T)-A |
| C01000331<br>8 | C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100il,H100kN)-9GS-ALB11(S112K)-A         |

La ausencia de unión a anticuerpos preexistentes se evaluó para los formatos finales en esencia como se expuso anteriormente en 6.9.

5      Hubo una reducción/prevención significativa de la unión de anticuerpos preexistentes a las principales HLE extendidas tras agregar una alanina C-terminal y modificar L11V y V89T en el bloque de construcción Alb8. Se observaron perfiles de unión de anticuerpos preexistentes similares para C010003313 ("3313") y C010003320 ("3320"). Esto también demuestra que el perfil de unión de los anticuerpos preexistentes parece ser independiente del enlazador.

10      Hubo una reducción/prevención significativa de la unión de anticuerpos preexistentes a las principales HLE extendidos tras agregar un Ala C-terminal y modificar S112K en el bloque de construcción Alb8. Se observaron perfiles de unión de anticuerpos preexistentes similares para C010003318 ("3318") en comparación con C010003326 ("3326"). Esto demuestra nuevamente que la reducción o prevención de anticuerpos preexistentes mediante la adición de una variante de Alb optimizada parece ser independiente del enlazador utilizado para unir el nanoanticuerpo principal a la variante de Alb optimizada.

15      Además, esto también demuestra que en este caso solo el bloque de construcción C-terminal (en este caso, la variante de Alb optimizada) debe modificarse para adquirir una reducción/prevención significativa de la unión de anticuerpos preexistentes a la construcción completa.

## 20      6.11 Potencia en los ensayos de activación y proliferación de células B

25      La potencia del candidato principal C010003318 se evaluó en un ensayo de activación de células B y proliferación de células B (véanse los Ejemplos 6.1.6 y 6.4). La potencia se comparó con 5C8 y CDP7657 no pegilado. Los resultados se resumen en la Tabla 6.11.

30

Tabla 6.11 Ensayo de activación de células B y proliferación de células B

| IC <sub>50</sub> (pM)      | 5c8 | CDP7657* | C010003318 |
|----------------------------|-----|----------|------------|
| Activation de células B    | 119 | 101      | 212        |
| Proliferation de células B | 51  | 864      | 308        |

\* CDP7657 no pegilado

35      Con base en los datos de proliferación de células B, se demostró que C010003318 tiene una potencia mayor que CDP7657 no pegilado, aunque C010003318 tiene una potencia 10 a 6 veces menor en comparación con 5C8.

40      Con base en los datos de activación de células B, se puede observar que CDP7657 y 5C8 no pegilados parecen ser aproximadamente más potentes por un factor 2 que C010003318.

En conclusión, 5C8 es aproximadamente 2-10 veces más potente que C010003318 en estos ensayos *in vitro*. En el ensayo de proliferación de células B más relevante (véase el Ejemplo 6.4), C010003318 es evidentemente más potente que CDP7657. En el ensayo de activación

de células B, parece que CDP7657 es aproximadamente más potente por un factor 2 que C010003318. Sin embargo, como se indica en el Ejemplo 6.6, la pegilación de CDP7657 disminuyó la actividad en 4 a 5 veces (véase el documento US2010/0104573).

- 5 Por lo tanto, C010003318 parece ser más potente que CDP7657 en todos los ensayos.

#### 6.12 Afinidad hacia CD40L

- 10 Para definir la afinidad por hCD40L de los nanoanticuerpos principales HLE biespecíficos finales, se realizó un ensayo de exclusión cinética (KinExA) en un KinExA 3200 (Sapidyne Inc.).

- 15 Luego se ingresaron las respuestas en el software KinExA Pro v 3.2.6 y se graficaron los porcentajes de nanoanticuerpos libres frente a las concentraciones de hCD40L. No se excluyeron valores atípicos del ajuste. No fue necesaria la corrección por unión inespecífica relacionada con la deriva o el ligando. Se observó una baja variación. Los valores graficados se ajustaron utilizando el método de análisis "Afinidad, Estándar". Los resultados de KD se muestran en la Tabla 6.12.

- 20 Tabla 6.12: Afinidad (pM) de C010003318 y C010003326 en el ensayo KinExA en solución

|            | KD (pM) [95% CI]   |
|------------|--------------------|
| C010003318 | 17 pM [12 – 22 pM] |
| C010003326 | 4 pM [3 – 6 pM]    |

6.13 Los estudios de TT en ratón y cynomolgus demuestran que los nanoanticuerpos son eficaces para neutralizar la actividad de CD40L *in vivo*

- 25 Con el fin de evaluar *in vivo* la capacidad de neutralización de CD40L de los nanoanticuerpos principales, se realizó un estudio de exposición a toxoide tetánico (TT) en ratones humanizados y mono cynomolgus.

- 30 6.13.1 Los nanoanticuerpos neutralizan la actividad de CD40L en estudios con TT en ratones humanizados.

- 35 Como los nanoanticuerpos no tenían reactividad cruzada con ratones CD40L (véase el Ejemplo 6.7.1), los ratones humanizados se inmunizaron todos los días con toxina tetánica (TT) y el efecto de la neutralización de CD40L sobre la respuesta de anticuerpos IgG específicos de TT se evaluó en diferentes momentos. Se administró nanocuerpo antes de la exposición a TT y cada 3 días para un total de 10 administraciones por individuo. El TT se administró el día 1 y el día 31. El nanoanticuerpo anti-CD40L 3318 disminuyó la respuesta de IgG a TT en estos ratones y este efecto fue significativo (datos no mostrados). El efecto inmunosupresor dependía de la dosis, pero todas las dosis evaluadas redujeron la respuesta de IgG mejor que el control. El efecto inmunosupresor de los nanoanticuerpos se confirmó por la ausencia de células B humanas maduras en el bazo de estos ratones tratados con nanoanticuerpos. De manera similar, en el estudio con TT de ratón, se demostró que los nanoanticuerpos 3313 y 3320 son eficaces para reducir significativamente la respuesta de IgG a TT en comparación con el grupo de vehículo. Además, estos nanoanticuerpos perjudican la sedimentación y el crecimiento de PBL hu en el bazo de ratones inmunodeficientes injertados también con PBMC humanas inmunizadas con TT (datos no mostrados).

- 50 Por lo tanto, todos los nanoanticuerpos probados son eficaces para neutralizar la actividad de CD40L *in vivo*.

### 6.13.2 Los nanoanticuerpos neutralizan la actividad de CD40L en estudios con TT en mono cynomolgus.

5 El estudio con TT en mono cynomolgus se realizó de forma similar al Ejemplo 6.13.1. En  
resumen, los monos cynomolgus se inmunizaron diariamente con toxina tetánica y el efecto  
de la neutralización de CD40L sobre la respuesta de anticuerpos IgG específicos para la TT  
se evaluó en diferentes momentos. Nanoanticuerpos, 5C8 y vehículo se administraron el Día  
0 y el Día 31. El Día 1 + 4h y el Día 31, se administró la TT. Como se representa en la  
10 Figura 7, el nanoanticuerpo C010003318 anti-CD40L perjudicó la respuesta de IgG a la TT  
en estos monos y este efecto fue significativo. El efecto inmunosupresor dependía de la  
dosis, pero todas las dosis evaluadas redujeron la respuesta de IgG mejor que el control.  
Los datos son indicativos de la saturación del objetivo soluble en todas las dosis de  
nanoanticuerpos.

15 Por lo tanto, todos los Nanoanticuerpos probados son eficaces para neutralizar la actividad  
de CD40L *in vivo*. Los datos en el mono cynomolgus confirman los datos en ratones y  
prueban la amplia aplicabilidad de los nanoanticuerpos, incluso sin una región Fc funcional.  
Notablemente, se demostró que una función efectora Fc de anti-CD40L está influyendo en la  
20 respuesta humoral a TT (Shock et al., 2015 Arthritis Research & Therapy 17: 234).

### 6.14 Evaluación *in vitro* del riesgo de TE/trombosis

25 Como se mencionó anteriormente, a pesar de la evidencia alentadora del efecto clínico, el  
desarrollo adicional de hu5C8 se suspendió debido a la mayor incidencia de eventos  
trombóticos cardiovasculares (TE) como resultado del tratamiento. Además, en un estudio  
de 5C8 en monos rhesus, se encontraron numerosos TE que incluyen trombos vasculares  
pulmonares y vasculopatía después de la administración de 5C8 (Wakefield et al., 2010  
Arthritis Rheum. 62: 1243).

30 Por lo tanto, antes de que los nanoanticuerpos anti-CD40L puedan usarse clínicamente, la  
evaluación de su seguridad es de suma importancia. La seguridad se evaluó en varios  
sistemas *in vivo* e *in vitro*. Los siguientes métodos y enfoques se diseñaron para evaluar el  
riesgo de TE y/o trombosis *in vitro*.

#### 35 6.14.1 Seguridad *in vitro* - ensayos plaquetarios.

40 Como ha sido descrito por Roth et al., que los mAbs anti-CD40L pueden inducir activación  
plaquetaria y agregación a través de complejos inmunes que agrupan FcγRIIIa en plaquetas,  
se probaron nanoanticuerpos anti-CD40L en activación plaquetaria y ensayo de agregación  
para investigar su potencial intrínseco para estimular plaquetas (Roth et al., 2004  
Transplantation 78: 1238-9).

45 C010003313 y C010003318 se analizaron en un ensayo de activación plaquetaria y un  
ensayo de agregación plaquetaria como se expuso anteriormente. 5C8 se tomó como un  
control positivo en estos ensayos, así como ADP. Tanto para voluntarios sanos como para  
pacientes con SLE, se observó activación plaquetaria para 5C8. Por el contrario,  
C010003313 y C010003318 demostraron un perfil no activador en voluntarios sanos y  
pacientes con SLE (Figura 3 y Figura 4, respectivamente). Además, estos nanoanticuerpos  
50 se analizaron en el ensayo de agregación plaquetaria con sangre de voluntarios sanos y  
pacientes con SLE, y se concluyó que no inducen agregación plaquetaria, mientras que 5C8  
sí. Los resultados del ensayo de agregación plaquetaria se representan en la Figura 5  
(voluntarios sanos) y la Figura 6 (pacientes con SLE).

Por lo tanto, en el ensayo de agregación y activación plaquetaria *in vitro* se demostró que los nanoanticuerpos no inducen plaquetas, mientras que 5C8 sí lo hace.

#### 6.14.2 Seguridad *in vitro* - Sistemas de activación de células endoteliales

CD40L de membrana se expresa transitoriamente en células T maduras activadas, restringidas principalmente a células T CD4<sup>+</sup>, pero no en células T en reposo. La expresión de CD40L de membrana también se ha detectado en células distintas de linfocitos T, a saber, plaquetas activadas, células primarias, mastocitos, basófilos y eosinófilos, mientras que la expresión de CD40 se demuestra en células B, células asesinas naturales, monocitos/macrófagos, células dendríticas en determinadas afecciones y ampliamente en células no hematopoyéticas incluyendo células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales. Como las células endoteliales son actores clave en la hemostasis junto a las plaquetas, la influencia de los agentes anti-CD40L en las células del endotelio se evaluó en dos sistemas que contienen HUVEC primarias (células endoteliales de la vena umbilical humana): el sistema 3C estimulado (para imitar la enfermedad cardiovascular/inflamación crónica) y el sistema HNo no estimulado (para imitar el endotelio vascular sano) (Bioseek). El nanoanticuerpo anti-CD40L, un nanoanticuerpo irrelevante de control, 5C8 y piclamilast como control positivo se probaron en cuatro concentraciones diferentes en este sistema.

Los resultados demuestran que el perfil del nanoanticuerpo se consideró no indicativo de ningún efecto sobre las células endoteliales (datos no mostrados). Por otro lado, piclamilast se asoció con un estado inflamatorio, mientras que el resultado más sorprendente se obtuvo con 5C8. Hasta el momento, no se han informado influencias del 5C8 en las células endoteliales, pero en ambos sistemas celulares se observó una respuesta clara y dependiente de la dosis. En particular, todos los marcadores monitorizados (inflamatorio, inmunomodulador, remodelación tisular y hemostasia) se incrementaron en uno o ambos sistemas celulares debido a 5C8.

En conclusión, los nanoanticuerpos probados no indujeron la activación de células endoteliales primarias, mientras que 5C8 sí lo hizo. Por lo tanto, los nanoanticuerpos anti-CD40L parecen ser seguros.

#### 6.14.3 Seguridad *in vitro* - Los nanoanticuerpos anti-CD40L no inician una señalización inversa

La unión de CD40L a su CD40 receptor induce señales directas dependiendo del estado de activación de las células y los niveles de expresión de los receptores en las células. Adicionalmente, se sabe que la unión de ligandos a miembros de la familia de TNFR (por ejemplo, CD40) puede iniciar la señalización inversa, que regula la proliferación celular, la secreción de citoquinas, el estallido oxidativo, el cambio de clase y la maduración de células T. Sin embargo, la señalización inversa no regulada o desproporcionada por miembros de la familia de TNF $\alpha$  puede dar como resultado una tormenta de citoquinas, que generalmente se conoce como liberación excesiva o incontrolada de citoquinas proinflamatorias (Eissner et al., 2004 Cytokine & Growth Factor Reviews 15: 353 -366).

Para evaluar más a fondo la seguridad, se evaluó el potencial de los nanoanticuerpos para iniciar una tormenta de citoquinas debido a la señalización inversa.

Se estimularon PBMC humanas de 10 donantes sanos con diferentes compuestos en diferentes concentraciones: Avastina, un anticuerpo monoclonal anti-CD3, CDP7657 y el nanoanticuerpo anti-CD40L C010003318. También se tomaron SEB y LPS para evaluar la capacidad de respuesta de las PBMC. Se utilizó Avastina como control negativo (Min &

Kawabata, 2009 en el Taller de la EMA "ensayos de liberación de citoquinas *in vitro*") y el anticuerpo anti-CD3 como control positivo.

El método para evaluar la liberación de citoquinas *in vitro* utilizando PBMC humanas consta de tres etapas consecutivas: aislamiento de PBMC humanas de capas leucocitarias y congelación, descongelación de las PBMC humanas y estimulación con diferentes compuestos y finalmente la cuantificación de las citoquinas en el sobrenadante del ensayo. El análisis de muestra se realizó en Eurofins Panlabs Inc. utilizando la plataforma Luminex (Life Technologies). Las citoquinas medidas fueron IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Las citoquinas se analizaron en 2 ensayos Luminex diferentes. El primer ensayo midió IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e IL-10 y el segundo ensayo midió TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Con base en los límites de detección de los kits determinados por el proveedor y los experimentos realizados en Ablynx en los que se realizó una estimación del grado de estimulación para cada citoquina, se ajustaron las diluciones de las muestras para ambos ensayos. Los ensayos se realizaron como se indica en el prospecto del kit y cada muestra se analizó por duplicado. El análisis de datos estadísticos se realizó sobre los resultados obtenidos para comparar todos los compuestos con el blanco (PBMC no estimuladas).

Los resultados demuestran que la producción de citoquina inducida por Avastina y el anticuerpo monoclonal anti-CD3 en las PBMC humanas fue mayor que la de las PBMC no estimuladas. Además, los niveles de las citoquinas inducidas por los compuestos de control positivo SEB y LPS fueron más altos que los del blanco. Para el compuesto CDP7657, los niveles de citoquinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  fueron comparables a los del blanco, mientras que para IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 se observaron algunas diferencias dependientes de la concentración probada. En la Figura 8 se muestra un resultado ilustrativo de la inducción de IL-6 tras la estimulación de las PBMC. En particular, se demostró que las inducciones de citoquina totales con el compuesto anti-CD3 y Avastina eran positivas en comparación con las muestras no estimuladas. La inducción con el compuesto CDP7657 dio como resultado niveles de IL-6 que fueron más altos que los de las muestras del blanco. Los niveles de IL-6 inducidos por el nanoanticuerpo C010003318 fueron en general similares a los niveles de IL-6 medidos en las muestras no estimuladas, excepto en la concentración de 20 nM, donde los niveles de IL-6 medidos fueron más altos que el blanco, aunque mínimamente (lo cual se cree ser un valor atípico). Los compuestos de control positivo SEB y LPS mostraron ser positivos en comparación con el blanco.

En general, la inducción de citoquinas por el nanoanticuerpos C010003318 de ejemplo fue comparable a la de las PBMC no estimuladas.

En conclusión, los nanoanticuerpos anti-CD40L no inician una tormenta de citoquina debido a la señalización inversa en un entorno *in vitro*. Esto confirma nuevamente la seguridad de los nanoanticuerpos.

6.15 Seguridad *in vivo* - Los nanoanticuerpos anti-CD40L son seguros en el mono rhesus

Se estableció un estudio adicional para evaluar la seguridad de los nanoanticuerpos anti-CD40L *in vivo*. En particular, se determinó si la administración subcutánea de nanoanticuerpos anti-CD40L se traduciría también en una falta de TE *in vivo* en monos rhesus.

Se administró el nanoanticuerpo C010003318 de ejemplo en una dosis de 30 mg/kg, 100 mg/kg y 300 mg/kg cada una en 3 monos rhesus hembra, una vez a la semana durante 4 semanas.

En este estudio se evaluaron los siguientes parámetros y puntos finales: signos clínicos, pesos corporales, cambios en el peso corporal, temperatura corporal, parámetros de

patología clínica (hematología, coagulación, química clínica, análisis de orina y fenotipado de linfocitos), inmunogenicidad (anticuerpo antifármaco (ADA), toxicocinética, farmacodinámica, hallazgos macroscópicos de necropsia, peso de órganos y exámenes histopatológicos. Los exámenes incluyeron lo siguiente.

Los procedimientos, observaciones y mediciones en vida enumerados a continuación se realizaron para todos los animales. Los animales fueron revisados una vez por la mañana y una vez por la tarde cada día para verificar su estado general de salud, la mortalidad y la morbilidad. Además, los animales se observaron diariamente desde la semana -2. A partir del día 1 (en los días de dosificación), los animales se observaron antes de la dosis y al menos 3 veces después de la dosificación. En días sin dosificación, los animales fueron revisados por la mañana y por la tarde. Al menos una vez a la semana, comenzando en la semana -2, todos los animales recibieron una observación clínica detallada. Todos los animales se examinaron regularmente a lo largo del día, en cada día de dosificación, para verificar la reacción al tratamiento. Se registró el inicio, la intensidad y la duración de los signos; se prestó especial atención a los animales durante y por la primera hora después de la dosificación. Los sitios de inyección se controlaron para determinar la reacción al tratamiento. Los pesos corporales se registraron semanalmente a partir de la semana -2. Se registró un peso el día de la necropsia programada. Todos los animales tuvieron una temperatura corporal registrada una vez durante el pretratamiento (por la tarde, en el momento esperado de la medición posterior a la dosis). Durante el período de dosificación, todos los animales tenían una temperatura corporal registrada semanalmente aproximadamente 8 horas después de la dosis en cada día de la dosificación y antes de la necropsia.

Se recogieron muestras de sangre (0,5 mL) en tubos K<sub>2</sub>EDTA analizados para los parámetros especificados en la Tabla 6.15A.

Tabla 6.15A Parámetros hematológicos

|                                            |                                           |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Recuento de glóbulos rojos                 | Componente plaquetario medio              |
| Hemoglobina                                | Volumen plaquetario medio                 |
| Hematocritos                               | Ancho de distribución de plaquetas        |
| Volumen celular medio                      | Recuento de glóbulos blancos              |
| Hemoglobina celular media                  | Neutrófilos                               |
| Concentración media de hemoglobina celular | Linfocitos                                |
| Ancho de la distribución de hemoglobina    | Monocitos                                 |
| Reticulocitos                              | Eosinófilos                               |
| Recuento de reticulocitos (absoluto)       | Basófilos                                 |
| Ancho de distribución de glóbulos rojos    | Células grandes no teñidas                |
| Recuenta de plaquetas                      | Velocidad de sedimentación de eritrocitos |
| Plaquetas                                  |                                           |

Se tomaron muestras de sangre (1 mL) en tubos que contenían citrato trisódico al 3,8% (p/v) y se procesó el plasma, que se analizó para los parámetros de tiempo de tromboplastina parcial activada, tiempo de protrombina y fibrinógeno.

Se tomaron muestras de sangre (1,5 mL) en tubos que contenían heparina de litio y se procesó el plasma, que se analizó para los parámetros especificados en la Tabla 6.15B.

Tabla 6.15B Parámetros de la química clínica

|         |                |
|---------|----------------|
| Urea    | Proteína total |
| Glucosa | Albúmina       |

|                            |                                |
|----------------------------|--------------------------------|
| Aspartato aminotransferasa | Globulina                      |
| Alanina aminotransferasa   | Relación de albúmina/globulina |
| Fosfatasa alcalina         | Colesterol                     |
| Creatina fosfoquinasa      | Colesterol LDL                 |
| Lactato deshidrogenasa     | Colesterol HDL                 |
| Sodio                      | Creatinina                     |
| Potasio                    | Bilirrubina total              |
| Cloruro                    | Calcio                         |
| Gamma glutamil transferasa | Fosfato inorgánico             |
| Glutamato deshidrogenasa   | Triglicéridos                  |
| Alfa amilasa               | Ácidos biliares totales        |
|                            | Inmunoglobulina G, M, A        |

Se recogieron muestras representativas de los tejidos identificados en la Tabla 6.15C de todos los animales y se conservaron en formalina amortiguada neutra al 10%, a menos que se indique lo contrario.

5

Tabla 6.15C Recolección y preservación de tejido

|                                                          |                                 |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Sitio de administración                                  | Laringe                         |
| Identificación del animal                                | Hígado                          |
| Arteria, aorta                                           | Pulmón                          |
| Frotis de médula ósea                                    | Ganglio linfático, mandibular   |
| Médula ósea, fémur                                       | Ganglio linfático, mesentérico  |
| Médula ósea, esternón                                    | Ganglio linfático, drenaje      |
| Hueso, fémur                                             | Músculo, esquelético            |
| Hueso, esternón                                          | Nervio, óptico <sup>a</sup> x 2 |
| Hueso, articulación de la rodilla                        | Nervio, ciático x 2             |
| Cerebro                                                  | Esófago                         |
| Cuello uterino                                           | Ovario x 2                      |
| Ojo <sup>a</sup> x 2                                     | Oviducto x 2                    |
| Vesícula biliar                                          | Páncreas                        |
| Glándula, suprarrenal x 2                                | Piel                            |
| Glándula, lagrimal x 2                                   | Intestino delgado, duodeno      |
| Glándula, mamaria x 2                                    | Intestino delgado, íleon        |
| Glándula, paratiroidea x 2                               | Intestino delgado, yeyuno       |
| Glándula, pituitaria                                     | Médula espinal                  |
| Glándula, salival x 2                                    | Bazo                            |
| Glándula, tiroides x 2                                   | Estómago                        |
| Lesiones/masas macroscópicas                             | Timo                            |
| Tejido linfoide asociado al intestino (Parches de Peyer) | Lengua                          |
| Corazón                                                  | Tráquea                         |
| Riñón x 2                                                | Uréter x 2                      |
| Intestino grueso, ciego                                  | Vejiga urinaria                 |
| Intestino grueso, colon                                  | Útero                           |
| Intestino grueso, recto                                  | Vagina                          |

Los tejidos identificados en la Tabla 6.15C se incluyeron en parafina, se seccionaron (4-6 µm), se montaron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La evaluación histopatológica fue realizada por un patólogo veterinario con formación y experiencia en patología animal de laboratorio. Un segundo patólogo realizó una revisión por pares de patología en la instalación de prueba.

10

La administración subcutánea de C010003318 a monos rhesus a 30, 100 o 300 mg/kg, una vez a la semana durante 4 semanas, se asoció con hallazgos microscópicos de agotamiento linfóide de centros germinales en los ganglios linfáticos (axilar, inguinal, mandibular y mesentérico) a todos los niveles de dosis y bazo, y hialinización de centros germinales en el bazo a razón de 30 y 100 mg/kg. Estos hallazgos eran efectos farmacológicos esperados del elemento del ensayo y, por lo tanto, se consideraron no adversos. No hubo efectos relacionados con el elemento de prueba sobre el peso de los órganos o la patología macroscópica. No se observaron cambios relacionados con el elemento de prueba en los signos clínicos observados o cambios en el peso corporal. No hubo efectos relacionados con el elemento de prueba en los parámetros de patología clínica.

En conclusión, la administración del nanoanticuerpo C010003318 de ejemplo por vía subcutánea una vez a la semana durante 4 semanas fue bien tolerada en monos rhesus hembra a niveles de hasta 300 mg/kg/semana. Los efectos en los órganos objetivo (tejidos linfoides) se observaron a niveles de 30 a 300 mg/kg/semana, pero se consideraron como resultado de la actividad farmacológica del elemento de prueba y, por lo tanto, no fueron adversos. Con base en estos resultados, se consideró que el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) era de 300 mg/kg/semana como la dosis más alta (probada).

Por lo tanto, incluso después de una exposición prolongada a altas dosis, no hay evidencia de que los nanoanticuerpos anti-CD40L induzcan TE *in vivo*.

#### 6.16 Evaluación de inmunogenicidad (ADA)

Para la evaluación de la inmunogenicidad, se recogieron muestras de sangre de todos los animales (véase el Ejemplo 6.15) para determinar la presencia de anticuerpos preexistentes (PEA) (véase el Ejemplo 6.9) o anticuerpos antifármacos emergentes (ADA).

Se realizó un análisis de muestra ADA para apoyar la evaluación toxicocinética y/o la evaluación de seguridad. Las muestras de plasma se evaluaron para determinar la presencia de anticuerpos antifármacos (ADA) usando un formato de puente basado en electroquimioluminiscencia (ECL) validado para el análisis de muestras ADA (en una plataforma MSD). Se recogieron muestras de los 4 grupos de animales, ya sea tratados con vehículo (n = 3) o tratados con 30, 100 o 300 mg/kg de nanoanticuerpo. Las muestras de sangre se recogieron de todos los animales antes del inicio del estudio (día -7 previo al estudio) y en el día 15 y el día 29 antes de la administración en ese día.

Las respuestas de todas las muestras estaban por debajo del punto de corte de detección, por lo que se concluyó que no se detectaron Ab previos en las muestras del día -7 previo al estudio y no se detectaron ADA emergentes del tratamiento en ninguna de las muestras tratadas con vehículo o los animales dosificados nanoanticuerpos. Además, estos resultados corroboran los hallazgos del Ejemplo 6.9.

Por lo tanto, no se detectaron ADA preexistentes o emergentes por el tratamiento a lo largo del estudio, con un ensayo de ADA suficientemente sensible y tolerante a los fármacos.

Los contenidos completos de todas las referencias (incluyendo referencias bibliográficas, patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas y solicitudes de patente en trámite junto con la presente) citadas a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente en la presente memoria como referencia, en particular para la enseñanza a la que se hace referencia aquí anteriormente.

Tabla 1. Secuencias enlazadoras preferidas de la invención

| Nombre | del | SEQ | ID | Secuencias de aminoácidos |
|--------|-----|-----|----|---------------------------|
|--------|-----|-----|----|---------------------------|

| enlazador   | NO: |                                   |
|-------------|-----|-----------------------------------|
| GS5 (5GS)   | 18  | GGGGS                             |
| GS7 (7GS)   | 19  | SGGSGGS                           |
| GS8 (8GS)   | 20  | GGGGGGGS                          |
| GS9 (9GS)   | 21  | GGGSGGGGS                         |
| GS10 (10GS) | 22  | GGGSGGGGS                         |
| GS15 (15GS) | 23  | GGGSGGGSGGGGS                     |
| GS18 (18GS) | 24  | GGGSGGGSGGGGGGS                   |
| GS20 (20GS) | 25  | GGGSGGGSGGGSGGGGS                 |
| GS25 (25GS) | 26  | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS             |
| GS30 (30GS) | 27  | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS         |
| GS35 (35GS) | 28  | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS     |
| GS40 (40GS) | 29  | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS |
| A3 (3A)     | 77  | AAA                               |

Tabla 2. Secuencias misceláneas

| Nombre                    | ID | Secuencias de aminoácidos                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hCD40L (UniProt P29965-1) | 1  | MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYL<br>HRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ<br>FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSK<br>TTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVT<br>FCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ<br>QSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL |
| hCD40 (UniProt Q6P2H9)    | 2  | MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQP<br>GQKLVS DCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHFHQHKYCDP<br>NLGLRVQQKGTSETDTICTEEGWHCTSEACESCVLHRSCSP<br>GFGVKQIDICQPHFPKDRGLNLLM                                                                                                                    |
| Ref A                     | 16 | HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS<br>WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKT<br>TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSS                                                                                                                                                       |
| Ref B                     | 17 | HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS<br>WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKT<br>TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSA                                                                                                                                                      |
| Etiqueta MYC-HIS          | 30 | AAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Etiqueta FLAG3-HIS6       | 31 | AAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHHH                                                                                                                                                                                                                                                     |

Tabla A-1: secuencias de aminoácidos de construcciones anti-CD40L ("ID" se refiere a la SEQ ID NO como se usa en este documento)

| Nombre                 | ID | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C01000 28B02           | 3  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISR<br>DNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDYWGQGTLLTVSS 3                                                                                                                                             |
| C01000 29C10           | 4  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYALGWFRQAPGKEREGVSCISSTESSDGYADSVKGRFTISR<br>RFTISRDSAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCATDQTLFGVCRGIATPDPGFWGQGTLLTVSS                                                                                                                                          |
| C0100044B07            | 5  | EVQLVESGGGLVQPGGRLRLSCAASGFTLDYYALAWFRQAPGKEREGVSCISSEGSTDYADYADSVKGRFTISR<br>RFTISRDTAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCATDETTFFSGSCTLSAATFGSWGQGTLLTVSS 10                                                                                                                                    |
| C0100046B03            | 6  | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTPLNHYHMAWFRQAPGKEREFVAAISSLLGSTDYSDSLKDRFTISR<br>RDNAKATLYLRMNNLKPEDTAVYYCAARETTHYSTSDRVNEMRHYDYWGQGTLLTVSS                                                                                                                                           |
| C010002366[28B02]      | 7  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR<br>DNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGTLLTVSS                                                                                                                                               |
| C01000332028B02-Alb129 | 80 | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR<br>DNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGG<br>GGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL<br>YADSVKGRFTISRDNKTLLYLMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA |
| C01000332328B02-Alb23  | 81 | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR<br>DNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGG<br>GGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPWVSSISGSGSDTL<br>YADSVKGRFTISRDNKNTLLYLMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA |
| C01000332628B02-Alb11  | 82 | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR<br>DNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGG<br>GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL<br>YADSVKGRFTISRDNKTLLYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVKSA |
| C010003290[46B03]      | 8  | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNHYHMAWFRQAPGKEREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTI<br>SRDNSKTTLLYLMNSLRPEDTAVYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYWGQGTLLTVSS                                                                                                                                            |
| C01000331846B03-Alb    | 9  | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNHYHMAWFRQAPGKEREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTI<br>SRDNSKTTLLYLMNSLRPEDTAVYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGG<br>VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLADSVKGRFTISR<br>DNAKTTLLYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVKSA       |
| C010003313 46B03-Alb   | 78 | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNHYHMAWFRQAPGKEREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTI<br>SRDNSKTTLLYLMNSLRPEDTAVYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYWGQGTLLTVSS 35<br>GGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLADSVKGRFTI<br>SRDNAKTTLLYLMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA     |
| C01000331546B03-Alb    | 79 | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNHYHMAWFRQAPGKEREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTI<br>SRDNSKTTLLYLMNSLRPEDTAVYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYWGQGTLLTVSS 40<br>GGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPWVSSISGSGSDTLADSVKGRFTI<br>ISRDNSKNTLLYLMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA     |

Tabla A-2: Secuencias para CDR y marcos, más combinaciones preferidas como se proporciona en la fórmula I, concretamente FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (los siguientes términos: "ID" se refiere a la SEQ ID NO dada; la primera columna se refiere a ID de todo el ISVD)

| ID | Constructo            | ID | FR1                           | ID | CDR1       | ID | FR2                | ID | CDR2              | ID | FR3                                             | ID | CDR3                     | ID | FR4              |
|----|-----------------------|----|-------------------------------|----|------------|----|--------------------|----|-------------------|----|-------------------------------------------------|----|--------------------------|----|------------------|
| 3  | C01000<br>28B02       | 39 | EVQLVESGGGLVQ<br>PGGSLRLSCAAS | 40 | GFTLEYAIG  | 41 | WFRQAPGK<br>EREGVS | 42 | CISSEGSTS         | 43 | YTDSVKGRFTISRDN<br>KNTVYLQMNSLKPEDT<br>AVYYCAT  | 44 | DPDRGFLGSSC<br>DTQSHQYDY | 45 | WGQGTLLVTV<br>SS |
| 4  | C01000<br>29C10       | 46 | EVQLVESGGGLVQ<br>PGGSLRLSCAAS | 47 | GFTLDYYALG | 48 | WFRQAPGK<br>EREGVS | 49 | CISSTESSD<br>GSTY | 50 | YADSVKGRFTISRDSA<br>KNTVYLQMNSLKPEDT<br>AVYYCAT | 51 | DQTLFGVCRGI<br>ATPDPGF   | 52 | WGQGTLLVTV<br>SS |
| 5  | C01000<br>44B07       | 53 | EVQLVESGGGLVQ<br>PGGRLRLSCAAS | 54 | GFTLDYYALA | 55 | WFRQAPGK<br>EREGVS | 56 | CISSEGST<br>DYAD  | 57 | YADSVKGRFTISRDTA<br>KNTVYLQMNSLKPEDT<br>AVYYCAT | 58 | DETTFFSGSCT<br>LSAATFGS  | 59 | WGQGTLLVTV<br>SS |
| 6  | C01000<br>46B03       | 60 | EVQLVESGGGLVQ<br>AGGSLRLSCAAS | 61 | GRTPLNYHMA | 62 | WFRQAPGK<br>EREFVA | 63 | AISSLLGSTD        | 64 | YSDSLKDRFTISRDN<br>KATLYLRMNSLKPEDT<br>AVYYCAA  | 65 | RETTHYSTSDR<br>VNEMRHYDY | 66 | WGQGTLLVTV<br>SS |
| 7  | C010002366<br>(28B02) | 67 | DVQLVESGGGLVQ<br>PGGSLRLSCAAS | 68 | GFTLEYAIG  | 69 | WFRQAPGK<br>EREGVS | 70 | CISSEGSTS         | 71 | YADSVKGRFTISRDN<br>KNTVYLQMNSLRPEDT<br>AVYYCAT  | 72 | DPDRGFLGSSC<br>DTQSHQYDF | 73 | WGQGTLLVTV<br>SS |
| 8  | C010003290<br>(46B03) | 32 | DVQLVESGGGLVQ<br>PGGSLRLSCAAS | 33 | GRTPLNYHMA | 34 | WFRQAPGK<br>EREFVA | 35 | AISSLLGSTD        | 36 | YADSVKGRFTISRDN<br>KTTLYLQMNSLRPEDT<br>AVYYCAA  | 37 | RETTHISTSDRV<br>NEIRNYDY | 38 | WGQGTLLVTV<br>SS |

Tabla A-3: Secuencias de aminoácidos de albúmina de suero que se une a ISVD (nanoanticuerpos Alb; "ID" se refiere a la SEQ ID NO como se usa en la presente memoria), incluidas las secuencias de CDR

| Nombre                 | ID | Secuencia                                                                                                                                     |
|------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ALB8 (Myc-His6)        | 10 | EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMN<br>SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH |
| Alb8                   | 11 | EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMN<br>SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS                        |
| Alb23                  | 12 | EVQLSLEGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM<br>NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS                         |
| Alb129                 | 13 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQM<br>NSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA                       |
| Alb132                 | 14 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM<br>NSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA                        |
| Alb11(S112K)-A(ALB135) | 15 | EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMN<br>SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVKSA                       |
| ALB CDR1               | 74 | SFGMS                                                                                                                                         |
| ALB CDR2               | 75 | SISGSGSDTLYADSVKG                                                                                                                             |
| ALB CDR3               | 76 | GGSLSR                                                                                                                                        |

Tabla 6.9.1: Comparación de mutaciones en las posiciones 11 y 112 con una extensión de alanina C-terminal sobre la unión de anticuerpos preexistentes presentes en sueros de pacientes con SLE

|                                                           | Muestras de suero obtenidas de pacientes con SLE |    |     |     |     |    |     | Muestras de plasma obtenidas de voluntarios sanos |     |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----|-----|-----|-----|----|-----|---------------------------------------------------|-----|
| Enlace promedio en la Referencia A (RU)                   |                                                  |    |     |     |     |    |     |                                                   |     |
| Referencia A                                              | 45                                               | 61 | 38  | 40  | 43  | 20 | 69  | 128                                               | 171 |
| Inhibición comparada con el enlace en la Referencia A (%) |                                                  |    |     |     |     |    |     |                                                   |     |
| Referencia B                                              | 20                                               | 16 | 13  | 45  | 53  | 86 | 101 | 95                                                | 90  |
| Referencia A (L11E)                                       | 63                                               | 88 | 117 | 61  | 87  | 88 | 92  | 68                                                | 21  |
| Referencia A (L11K)                                       | 87                                               | 97 | 107 | 54  | 106 | 79 | 102 | 100                                               | 61  |
| Referencia A (L11V)                                       | 68                                               | 84 | 49  | 56  | 95  | 91 | 21  | 23                                                | 6   |
| Referencia A (L11Y)                                       | 27                                               | 71 | 111 | 37  | 84  | 74 | 72  | 13                                                | 3   |
| Referencia A (S112E)                                      | 13                                               | 56 | 91  | 77  | 74  | 91 | 94  | 84                                                | 22  |
| Referencia A (S112F)                                      | -6                                               | 18 | 26  | -13 | 62  | 69 | 117 | 74                                                | 43  |
| Referencia A (S112K)                                      | 71                                               | 77 | 105 | 80  | 116 | 86 | 120 | 87                                                | 62  |
| Referencia A (S112L)                                      | -36                                              | 36 | 48  | -24 | 123 | 19 | 84  | 91                                                | 3   |

5

10

15

20

Tabla 6.9.2 (a): influencia de diferentes mutaciones de unión por anticuerpos preexistentes en muestras obtenidas de pacientes con SLE y voluntarios humanos

|                                                                                   |      |      | Mutación(s) |       |      | Muestras obtenidas de pacientes con SLE |       |       |       |            | Muestra obtenida de un voluntario sano |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|------|-------------|-------|------|-----------------------------------------|-------|-------|-------|------------|----------------------------------------|
|                                                                                   | L11K | L11V | V89T        | S112K | 114A | SLE25                                   | SLE37 | SLE39 | SLE41 | NB13025-14 | 004-030-ABL-02                         |
| Unión promedio a la Referencia A                                                  |      |      |             |       |      |                                         |       |       |       |            |                                        |
| Unión promedio para la Referencia A                                               |      |      |             |       |      | 38                                      | 66    | 30    | 41    | 45         | 175                                    |
| Inhibición comparada con la unión promedio a la Referencia A capturada en HSA (%) |      |      |             |       |      |                                         |       |       |       |            |                                        |
| Referencia A + V89T, sin extensión C-terminal                                     |      | x    | x           |       |      | 100                                     | 98    | 100   | 100   | 98         | 9                                      |
| Referencia A + V89T + alanina C-terminal                                          |      | x    | x           |       | x    | 97                                      | 98    | 100   | 98    | 100        | 100                                    |
| Referencia A + S112 K, sin extensión C-terminal                                   | X    |      |             | x     |      | 100                                     | 100   | 100   | 100   | 98         | 100                                    |
| Referencia A + S 112K + alanina C-terminal                                        | X    |      |             | x     | x    | 100                                     | 100   | 100   | 99    | 99         | 100                                    |

5

10

15

Tabla 6.9.2 (b): influencia de diferentes mutaciones de unión por anticuerpos preexistentes en muestras obtenidas de pacientes con SLE y voluntarios humanos

|                                                                                   | Mutación |      |       |      | Muestras obtenidas de pacientes con SLE |       |       |       |            | Muestra obtenida de un voluntario sano |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|------|-------|------|-----------------------------------------|-------|-------|-------|------------|----------------------------------------|
|                                                                                   | L11V     | V89L | S112Q | 114A | SLE25                                   | SLE37 | SLE39 | SLE41 | NB13025-14 | 004-030-ABL-02                         |
| Unión promedio a la Referencia A                                                  |          |      |       |      |                                         |       |       |       |            |                                        |
| Unión promedio para la Referencia A                                               |          |      |       |      | ND                                      | 71    | 51    | ND    | 41         | 180                                    |
| Inhibición comparada con la unión promedio a la Referencia A capturada en HSA (%) |          |      |       |      |                                         |       |       |       |            |                                        |
| Referencia A + V89L + S 112Q + alanina C-terminal                                 |          | x    | x     | x    | ND                                      | 100   | 100   | ND    | 100        | 97                                     |
| Referencia A + L11V + S 112Q + alanina C-terminal                                 | x        |      | x     | x    | ND                                      | 100   | 100   | ND    | 100        | 99                                     |
| Referencia A + S 112Q + alanina C-terminal                                        |          |      | x     | x    | ND                                      | 92    | 85    | ND    | 94         | 100                                    |

5

10

15

20

Tabla 6.9.3 (a): influencia de diferentes mutaciones en la unión por anticuerpos preexistentes en muestras de pacientes con SLE y voluntarios humanos

|                                                                                   | Mutación(es) |      |      |       |      | Muestras obtenidas de pacientes con SLE |       |       |       |            | Muestras de voluntario sano |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------|------|------|-------|------|-----------------------------------------|-------|-------|-------|------------|-----------------------------|
|                                                                                   | L11V         | V89L | V89T | S112K | 114A | SLE25                                   | SLE37 | SLE39 | SLE41 | NB13025-14 | 004-030-ABL-02              |
| Unión promedio a la Referencia A                                                  |              |      |      |       |      |                                         |       |       |       |            |                             |
| Referencia A                                                                      |              |      |      |       |      | 28                                      | 44    | 26    | 33    | 30         | 151                         |
| Inhibición comparada con la unión promedio a la Referencia A capturada en HSA (%) |              |      |      |       |      |                                         |       |       |       |            |                             |
| Referencia A + V89L, sin extensión C-terminal                                     |              | x    |      |       |      | 77                                      | 64    | 53    | 63    | 41         | 35                          |
| Referencia A + V89L + alanina C-terminal                                          |              | x    |      |       | x    | 35                                      | 27    | 63    | 42    | 46         | 83                          |
| Referencia A + V89T, sin extensión C-terminal                                     |              |      | x    |       |      | 68                                      | 12    | 84    | 100   | 71         | 11                          |
| Referencia A + V89T + alanina C-terminal                                          |              |      | x    |       | x    | 46                                      | 35    | 71    | 100   | 97         | 99                          |
| Referencia A + V89T + L11V, sin extensión C-terminal                              | x            |      | x    |       |      | 100                                     | 97    | 100   | 100   | 100        | 16                          |
| Referencia A + V89T + L11V + alanina C-terminal                                   | x            |      | x    |       | x    | 100                                     | 100   | 100   | 100   | 100        | 67                          |
| Referencia A + S112K + V89L, sin extensión C-terminal                             |              | x    |      | x     |      | 100                                     | 100   | 100   | 100   | 100        | 85                          |
| Referencia A + S112K + V89L + alanina C-terminal                                  |              | x    |      | x     | x    | 100                                     | 100   | 100   | 100   | 100        | 100                         |
| Referencia A + S112K + L11V, sin extensión C-terminal                             | x            |      |      | x     |      | 100                                     | 100   | 100   | 100   | 100        | 64                          |
| Referencia A + S112K + L11V + alanina C-terminal                                  | x            |      |      | x     | x    | 100                                     | 100   | 100   | 100   | 100        | 100                         |