

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 272**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/JP2013/064979**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13180201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13796975 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021 EP 2857419**

54 Título: **Molécula de unión a antígenos para eliminar antígenos agregados**

30 Prioridad:

30.05.2012 JP 2012123782

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

27.09.2021

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, Ukima 5-chome Kita-ku
Tokyo 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI;
HIRONIWA, NAOKA y
ITO, ERIKO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 856 272 T3

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

DESCRIPCIÓN

Molécula de unión a antígenos para eliminar antígenos agregados

Campo técnico

En el presente documento se describen usos de moléculas de unión a antígenos para eliminar antígenos agregados del plasma; métodos para eliminar antígenos agregados del plasma, que comprenden administrar moléculas de unión a antígenos; composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de unión a antígenos que son capaces de eliminar antígenos agregados del plasma; métodos de selección de moléculas de unión a antígenos para eliminar antígenos agregados del plasma; y métodos para producir moléculas de unión a antígenos para eliminar antígenos agregados del plasma.

Antecedentes de la técnica

Cuando las proteínas forman agregados debido a varios factores, como mutaciones genéticas y cambios ambientales, se sabe que se convierten en causas de diversas enfermedades al reducir las funciones fisiológicas de las proteínas o al presentar efectos tóxicos en las células. Por ejemplo, cuando el β -amiloide se agrega y se acumula en el cerebro, las células nerviosas se degeneran y se desarrolla la enfermedad de Alzheimer. Además, cuando la cadena L de inmunoglobulina se agrega y se deposita en cada órgano para causar insuficiencia orgánica, se desarrolla amiloidosis AL. De manera similar a estas enfermedades, un grupo de enfermedades caracterizadas por la acumulación extracelular de varios agregados de proteínas se llama amiloidosis, y la clasificación de los Comités de Investigación sobre Enfermedades Intratables especificadas por el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón (ahora Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón) informa que hay diez tipos de enfermedades de amiloidosis sistémica y diez tipos de enfermedades de amiloidosis localizada. Además de la amiloidosis, la enfermedad de α -sinucleína se conoce como una enfermedad en la que se deposita α -sinucleína agregada en las células nerviosas. Algunas enfermedades de Parkinson hereditarias son causadas por el depósito de α -sinucleína en las neuronas cerebrales y se las considera un tipo de enfermedad de α -sinucleína. Como se describió anteriormente, en el mundo se conocen muchas enfermedades causadas por agregados de proteínas, pero el mecanismo de agregación de proteínas aún no está claro; y para muchas de estas enfermedades, no existe un agente terapéutico definitivo.

Recientemente, los anticuerpos están llamando la atención como productos farmacéuticos, ya que tienen una alta estabilidad en el plasma y tienen pocos efectos secundarios. En la actualidad, se encuentran disponibles en el mercado varios productos farmacéuticos de anticuerpos de tipo IgG y muchos productos farmacéuticos de anticuerpos se encuentran actualmente en desarrollo (documentos que no son de patente 1 y 2).

Por otra parte, la capacidad neutralizadora de antígenos de una única molécula de anticuerpo depende de su afinidad. Al aumentar la afinidad, un antígeno puede neutralizarse con una cantidad menor de anticuerpo. Se pueden usar varios métodos para mejorar la afinidad del anticuerpo (documento que no es de patente 6). Además, si la afinidad pudiera hacerse infinita uniéndose covalentemente el anticuerpo al antígeno, una sola molécula de anticuerpo podría neutralizar una molécula de antígeno (un anticuerpo divalente puede neutralizar dos moléculas de antígeno). Sin embargo, la neutralización estequiométrica de un anticuerpo contra un antígeno (un anticuerpo divalente contra dos antígenos) es el límite de los métodos preexistentes y, por lo tanto, ha sido imposible neutralizar completamente el antígeno con una cantidad de anticuerpo menor que la cantidad de antígeno. En otras palabras, el efecto de mejora de la afinidad tiene un límite (documento que no es de patente 9). Para prolongar el efecto de neutralización de un anticuerpo neutralizante durante un cierto período, el anticuerpo debe administrarse a una dosis mayor que la cantidad de antígeno producido en el cuerpo durante el mismo período. Por lo tanto, con solo la mejora descrita anteriormente de la farmacocinética de anticuerpos o la tecnología de maduración por afinidad, se produjeron limitaciones con respecto a la reducción de la dosis de anticuerpo requerida. Por consiguiente, para mantener el efecto neutralizante de antígenos del anticuerpo durante un período diana con una cantidad del anticuerpo menor que la cantidad de antígeno, un solo anticuerpo debe neutralizar múltiples antígenos.

Como método novedoso para lograr este objetivo, se ha informado recientemente del uso de un anticuerpo que se une a un antígeno de una manera dependiente del pH para permitir que una sola molécula de anticuerpo se una a múltiples moléculas de antígeno (documento de patente 1 y documento que no es de patente 5). Los anticuerpos con unión al antígeno dependiente del pH, que se unen fuertemente a un antígeno en condiciones neutras en el plasma y se disocian del antígeno en condiciones ácidas en el endosoma, pueden disociarse del antígeno en el endosoma. Cuando un anticuerpo con unión al antígeno dependiente del pH que se ha disociado del antígeno es reciclado al plasma por FcRn, el anticuerpo puede unirse nuevamente a un antígeno; por lo tanto, una sola molécula de anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH puede unirse repetidamente a múltiples antígenos. Un anticuerpo de reciclaje de este tipo será muy útil como producto farmacéutico, ya que una sola molécula de anticuerpo puede unirse repetidamente a múltiples antígenos.

Además, la retención en plasma de un antígeno es muy corta en comparación con la de los anticuerpos que se reciclan al unirse a FcRn. Cuando un anticuerpo típico con una retención prolongada en plasma se une a dicho antígeno, la retención en plasma del complejo antígeno-anticuerpo se prolonga al mismo nivel que la del anticuerpo. Por tanto, cuando se administra un anticuerpo típico, el anticuerpo se une a un antígeno, la retención plasmática del antígeno se

prolonga (resulta difícil eliminarlo del plasma) al unirse al anticuerpo y, por tanto, aumenta la concentración de antígeno plasmático. Por otro lado, los anticuerpos con unión al antígeno dependiente del pH pueden suprimir el aumento de la concentración de antígeno en el plasma al disociarse del antígeno en el endosoma. Sin embargo, incluso con dicho anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH, la concentración de antígeno en plasma puede aumentar mediante la administración de anticuerpos en comparación con antes de la administración de anticuerpos.

Recientemente, se produjeron anticuerpos mejorando la propiedad de unión a FcRn de anticuerpos con unión al antígeno dependiente del pH en una condición neutra, y se descubrió que la administración de tales anticuerpos puede disminuir la concentración de antígeno en plasma en comparación con antes de la administración de los anticuerpos (documento de patente 2). Mientras que la administración de anticuerpos de anticuerpos reciclados, como los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH y los anticuerpos típicos, da como resultado un aumento de la concentración de antígeno en el plasma, los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH con unión mejorada a FcRn en condiciones neutras pueden disminuir la concentración de antígeno en plasma. mediante la administración de anticuerpos. Dichos anticuerpos son muy útiles como productos farmacéuticos ya que pueden eliminar activamente antígenos del plasma.

Sin embargo, para enfermedades en las que los agregados de proteínas son una causa de enfermedad, los monómeros que tienen una función normal coexisten en el plasma con los agregados que causan la enfermedad y se desean anticuerpos que tengan la propiedad de eliminar selectivamente los agregados del plasma.

Los documentos de la técnica anterior se muestran a continuación.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO 2009/125825, MOLÉCULA DE UNIÓN A ANTÍGENOS CAPAZ DE UNIRSE A DOS O MÁS MOLÉCULAS DE ANTÍGENO REPETIDAMENTE

Documento de patente 2: WO 2011/122011, ANTICUERPOS CON AFINIDAD MODIFICADA POR FCRN QUE ESTIMULAN LA ELIMINACIÓN DE ANTÍGENOS

Documentos que no son de patente

Documento que no es de patente 1: Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M. Reichert, Clark J. Rosensweig, Laura B. Faden y Matthew C. Dewitz, Nature Biotechnology, 23, 1073-1078 (2005).

Documento que no es de patente 2: Pavlou A.K., Belsey M.J., The therapeutic antibodies market to 2008, Eur. J. Pharm. Biopharm., abril de 2005, 59(3):389-396.

Documento que no es de patente 3: Rajpal A., Beyaz N., Haber L., Cappuccilli G., Yee H., Bhatt R.R., Takeuchi T., Lerner R.A., Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2005), 102 (24), 8466-8471.

Documento que no es de patente 4: Rathanaswami P., Roalstad S., Roskos L., Su Q.J., Lackie S., Babcook J., Demonstration of an *in vivo* generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8, Biochem. Biophys. Res. Comun. (2005), 334 (4), 1004-1013-

Documento que no es de patente 5: Igawa T, *et al.*, Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization, Nat. Biotechnol., 2010, 28, 1203-1207.

Sumario

Problemas por resolver

Para el tratamiento de enfermedades en las que los agregados de proteínas son una causa de la enfermedad, se desean anticuerpos que tengan la propiedad de eliminar selectivamente los agregados del plasma. Sin embargo, los anticuerpos típicos cuya unión a FcRn no se mejora en condiciones neutras pueden posiblemente aumentar la concentración de antígeno en plasma como se describe en la técnica anterior. En tales casos, se retrasa la eliminación de las proteínas que causan la enfermedad, y dichas proteínas tenderán a acumularse, provocando efectos negativos como una mayor citotoxicidad.

Por otro lado, mientras que los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH con unión mejorada a FcRn pueden eliminar antígenos del plasma, en enfermedades en las que los agregados son la causa, los monómeros que tienen funciones normales coexisten en el plasma con los agregados que causan la enfermedad y, por lo tanto, incluso si se usa un anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH con unión mejorada a FcRn, no solo se pueden eliminar los agregados sino también los monómeros normales. Además, cuando la proporción de los monómeros presentes en el plasma es abrumadoramente grande en relación con los agregados, también existe la posibilidad de que la eliminación de los monómeros se lleve a cabo preferentemente y que la eliminación de los agregados pueda resultar difícil.

La presente invención se realizó en vista de tales circunstancias. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir moléculas de unión a antígenos que pueden eliminar agregados de proteínas que causan enfermedades con preferencia a los monómeros de proteínas del plasma. También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígenos.

5 Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores llevaron a cabo estudios dedicados para resolver los objetivos mencionados anteriormente. Como resultado, los presentes inventores produjeron con éxito moléculas de unión a antígenos que pueden eliminar agregados de proteínas con preferencia a los monómeros del plasma, mediante la introducción de una región Fc y un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de la concentración de iones en una molécula de unión a antígenos que se une a un antígeno formador de agregados.

Más específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

[1] un método para producir un anticuerpo que es capaz de eliminar selectivamente agregados de proteínas que causan enfermedades con preferencia a los monómeros de proteínas del plasma, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

15 (a) seleccionar un anticuerpo:

(A) en el que la proporción de la KD (constante de disociación) del anticuerpo a dichos agregados de proteínas bajo un pH intracelular de 5,8 y una concentración de iones calcio de 3 μ M, y un pH extracelular de 7,4 y una concentración de iones calcio de 1,2 mM es 2 o más;

(B) en el que la actividad de unión al receptor FcRn de un complejo formado entre dichos agregados de proteínas y el anticuerpo es mayor que la actividad de unión al receptor FcRn de un complejo formado entre la proteína no agregada y el anticuerpo; y

(C) en el que la proporción de la eliminación plasmática de dicha proteína agregada en ausencia de dicho anticuerpo a la eliminación plasmática de dicha proteína agregada en presencia de dicho anticuerpo es 1,5 o más veces mayor que la misma proporción de eliminación plasmática para dicha proteína no agregada;

(b) cultivar una célula hospedante que comprende un vector que porta un gen que codifica el anticuerpo seleccionado en la etapa (a); y

(c) aislar el anticuerpo del cultivo obtenido en la etapa (b);

[2] el método de [1], en el que la proteína es huntingtina, ataxina-1, ataxina-2, α 1A del canal de Ca, ataxina-7, proteína de unión a TATA, MDJ, DRPLA, receptor de andrógenos, α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, neuroserpina, inhibidor de C1, antitrombina III, A β , L-ch, transtiretina, SAA, β 2M, H-ch, cistatina C, α sinucleína, amilina, hemoglobina, cristalina, IgA, proteína Tau, proteína de unión al sitio TAR del ADN de 43 kDa (TDP-43), superóxido dismutasa (SOD1), FUS (condensado en el gen del sarcoma), prión, PHOX2B, ARX, proteína de unión a poliadenilato nuclear 1 (PABPN1), disferlina, desmina, GFAP o queratina 5/14;

[3] el método de [1] o [2], en el que el anticuerpo comprende una región Fc que es una región Fc representada por cualquiera de SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12;

[4] el método de [1] o [2], en el que en una condición de pH ácido, la actividad de unión a FcRn de la región Fc comprendida en el anticuerpo se mejora en comparación con la de la región Fc representada por cualquiera de SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12;

[5] el método de [4], en el que la región Fc es una región Fc en la que al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos en las posiciones 238, 244, 245, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 265, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 316, 317, 318, 332, 339, 340, 341, 343, 356, 360, 362, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 385, 386, 387, 388, 389, 400, 413, 415, 423, 424, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 438, 439, 440, 442 y 447, según la numeración EU, están sustituidos en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por cualquiera de SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12;

[6] el método de [5], en el que la región Fc comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

Leu para el aminoácido en la posición 238;

Leu para el aminoácido en la posición 244;

Arg para el aminoácido en la posición 245;

Pro para el aminoácido en la posición 249;

- Gln o Glu para el aminoácido en la posición 250, o
 Arg, Asp, Glu o Leu para el aminoácido en la posición 251;
 Phe, Ser, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 252;
 Ser o Thr para el aminoácido en la posición 254;
- 5 Arg, Gly, Ile o Leu para el aminoácido en la posición 255;
 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 256;
 Ala, Ile, Met, Asn, Ser o Val para el aminoácido en la posición 257;
 Asp para el aminoácido en la posición 258;
 Ser para el aminoácido en la posición 260;
- 10 Leu para el aminoácido en la posición 262;
 Lys para el aminoácido en la posición 270;
 Leu o Arg para el aminoácido en la posición 272;
 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 279;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 283;
- 15 Asn para el aminoácido en la posición 285;
 Phe para el aminoácido en la posición 286;
 Asn o Pro para el aminoácido en la posición 288;
 Val para el aminoácido en la posición 293;
 Ala, Glu, Gln o Met para el aminoácido en la posición 307;
- 20 Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val o Trp para el aminoácido en la posición 311;
 Pro para el aminoácido en la posición 309;
 Ala, Asp o Pro para el aminoácido en la posición 312;
 Ala o Leu para el aminoácido en la posición 314;
 Lys para el aminoácido en la posición 316;
- 25 Pro para el aminoácido en la posición 317;
 Asn o Thr para el aminoácido en la posición 318;
 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser o Trp para el aminoácido en la posición 332;
 Asn, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 339;
 Pro para el aminoácido en la posición 341;
- 30 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 343;
 Arg para el aminoácido en la posición 375;
 Gly, Ile, Met, Pro, Thr o Val para el aminoácido en la posición 376;
 Lys para el aminoácido en la posición 377;
 Asp, Asn o Val para el aminoácido en la posición 378;
- 35 Ala, Asn, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 380;
 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 382;
 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 385;

- Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 386;
 Ala, Arg, His, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 387;
 Asn, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 389;
 Asn para el aminoácido en la posición 423;
 5 Asn para el aminoácido en la posición 427;
 Leu, Met, Phe, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 428;
 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 430;
 His o Asn para el aminoácido en la posición 431;
 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 433;
 10 Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434;
 Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met o Thr para el aminoácido en la posición 436;
 Lys, Leu, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 438;
 Lys para el aminoácido en la posición 440, o
 Lys para el aminoácido en la posición 442; y
 15 Ile, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 308;
 como se indica por la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por cualquiera de las SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12;
 [7] el método de [1] o [2], en el que en una condición de intervalo de pH neutro, la actividad de unión a FcRn de la región Fc comprendida en el anticuerpo se mejora en comparación con la de la región Fc representada por cualquiera de SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12;
 20 [8] el método de [7], donde la región Fc es una región Fc en la que al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consta de aminoácidos en las posiciones 237, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 y 436, según la numeración EU, están sustituidos en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por cualquiera de SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12;
 25 [9] el método de [8], en el que la región Fc comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de:
 Met para el aminoácido en la posición 237;
 Ile para el aminoácido en la posición 248;
 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 250;
 30 Phe, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 252;
 Thr para el aminoácido en la posición 254;
 Glu para el aminoácido en la posición 255;
 Asp, Asn, Glu o Gln para el aminoácido en la posición 256;
 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 257;
 35 His para el aminoácido en la posición 258;
 Ala para el aminoácido en la posición 265;
 Ala o Glu para el aminoácido en la posición 286;
 His para el aminoácido en la posición 289;
 Ala para el aminoácido en la posición 297;
 40 Ala para el aminoácido en la posición 303;

- Ala para el aminoácido en la posición 305;
- Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 307;
- Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 308;
- Ala, Asp, Glu, Pro o Arg para el aminoácido en la posición 309;
- 5 Ala, His o Ile para el aminoácido en la posición 311;
- Ala o His para el aminoácido en la posición 312;
- Lys o Arg para el aminoácido en la posición 314;
- Ala, Asp o His para el aminoácido en la posición 315;
- Ala para el aminoácido en la posición 317;
- 10 Val para el aminoácido en la posición 332;
- Leu para el aminoácido en la posición 334;
- His para el aminoácido en la posición 360;
- Ala para el aminoácido en la posición 376;
- Ala para el aminoácido en la posición 380;
- 15 Ala para el aminoácido en la posición 382;
- Ala para el aminoácido en la posición 384;
- Asp o His para el aminoácido en la posición 385;
- Pro para el aminoácido en la posición 386;
- Glu para el aminoácido en la posición 387;
- 20 Ala o Ser para el aminoácido en la posición 389;
- Ala para el aminoácido en la posición 424;
- Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 428;
- Lys para el aminoácido en la posición 433;
- Ala, Phe, His, Ser, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434; y
- 25 His, Ile, Leu, Phe, Thr o Val para el aminoácido en la posición 436;
- como se indica mediante la numeración EU en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por cualquiera de SEQ ID NO:9, 10, 11 y 12;
- [10] el método de uno cualquiera de [1] a [6] en el que el anticuerpo comprende una región Fc que incluye una región Fc que tiene una actividad de unión al receptor Fcγ más alta que la de la región Fc de una IgG humana nativa;
- 30 [11] el método de [10], en el que la región Fc comprende en su secuencia de aminoácidos al menos uno o más aminoácidos que son diferentes de los aminoácidos de la región Fc de IgG humana nativa seleccionados del grupo de posiciones 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 250, 251, 254, 255, 256, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299,
- 35 300, 301, 302, 303, 304, 305, 311, 313, 315, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 376, 377, 378, 379, 380, 382, 385, 392, 396, 421, 427, 428, 429, 434, 436 y 440 (numeración EU);
- [12] el método de [11], en el que la región Fc comprende en su secuencia de aminoácidos al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de:
- 40 Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 221;
- Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 222;

- Phe, Trp, Glu o Lys para el aminoácido en la posición 223;
Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 224;
Glu, Lys o Trp para el aminoácido en la posición 225;
Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 227;
5 Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 228;
Ala, Glu, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 230;
Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 231;
Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 232;
Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 233;
10 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 234;
Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 235;
Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 236;
Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 237;
Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 238;
15 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 239;
Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 240;
Asp, Glu, Leu, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 241;
Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 243;
His para el aminoácido en la posición 244;
20 Ala para el aminoácido en la posición 245;
Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 246;
Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 247;
Glu, His, Gln o Tyr para el aminoácido en la posición 249;
Glu o Gln para el aminoácido en la posición 250;
25 Phe para el aminoácido en la posición 251;
Phe, Met o Tyr para el aminoácido en la posición 254;
Glu, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 255;
Ala, Met o Pro para el aminoácido en la posición 256;
Asp, Glu, His, Ser o Tyr para el aminoácido en la posición 258;
30 Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 260;
Ala, Glu, Phe, Ile o Thr para el aminoácido en la posición 262;
Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 263;
Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 264;
Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 265;
35 Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 266;
Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 267;
Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 268;

- Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 269;
 Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 270;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 271;
 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 272;
 5 Phe o Ile para el aminoácido en la posición 273;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 274;
 Leu o Trp para el aminoácido en la posición 275;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 276;
 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 278;
 10 Ala para el aminoácido en la posición 279;
 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 280;
 Asp, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 281;
 Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 282;
 Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg o Tyr para el aminoácido en la posición 283;
 15 Asp, Glu, Leu, Asn, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 284;
 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 285;
 Glu, Gly, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 286;
 Asn, Asp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 288;
 Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 290;
 20 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 291;
 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 292;
 Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 293;
 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 294;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 295;
 25 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 296;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 297;
 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 298;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 299;
 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 300;
 30 Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 301;
 Ile para el aminoácido en la posición 302;
 Asp, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 303;
 Asp, His, Leu, Asn o Thr para el aminoácido en la posición 304;
 Glu, Ile, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 305;
 35 Ala, Asp, Asn, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 311;
 Phe para el aminoácido en la posición 313;
 Leu para el aminoácido en la posición 315;

- Glu o Gln para el aminoácido en la posición 317;
- His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 318;
- Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 320;
- Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 322;
- 5 Ile para el aminoácido en la posición 323;
- Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 324;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 325;
- Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 326;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 327;
- 10 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 328;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 329;
- Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 330;
- Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 331;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 332;
- 15 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 333;
- Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 334;
- Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 335;
- Glu, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 336;
- Glu, His o Asn para el aminoácido en la posición 337;
- 20 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 339;
- Ala o Val para el aminoácido en la posición 376;
- Gly o Lys para el aminoácido en la posición 377;
- Asp para el aminoácido en la posición 378;
- Asn para el aminoácido en la posición 379;
- 25 Ala, Asn o Ser para el aminoácido en la posición 380;
- Ala o Ile para el aminoácido en la posición 382;
- Glu para el aminoácido en la posición 385;
- Thr para el aminoácido en la posición 392;
- Leu para el aminoácido en la posición 396;
- 30 Lys para el aminoácido en la posición 421;
- Asn para el aminoácido en la posición 427;
- Phe o Leu para el aminoácido en la posición 428;
- Met para el aminoácido en la posición 429;
- Trp para el aminoácido en la posición 434;
- 35 Ile para el aminoácido en la posición 436; y
- Gly, His, Ile, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 440;
- como lo indica la numeración EU;

[13] el método de uno cualquiera de [1] a [9], en el que el anticuerpo comprende una región Fc que tiene una mayor actividad de unión hacia un receptor Fcy inhibidor que hacia un receptor Fcy activador;

[14] el método de [13], en el que el receptor de Fcy inhibidor es FcyRIIb humano;

5 [15] el método de [13] o [14], en el que el receptor Fcy activador es FcyRIa humano, FcyRIIa (R) humano, FcyRIIa (H) humano, FcyRIIIa (V) o FcyRIIIa (F) humano;

[16] el método de uno cualquiera de [13] a [15], en el que el aminoácido en la posición 238 o 328 (numeración EU) en la región Fc es diferente del aminoácido en la región Fc de la IgG humana nativa;

[17] el método de [16], en el que el aminoácido en la posición 238 de la región Fc es Asp o el aminoácido en la posición 328 de la región Fc es Glu como se indica mediante la numeración EU; y

10 [18] el método de [16] o [17], en el que la secuencia de aminoácidos de la región Fc comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

Asp para el aminoácido en la posición 233;

Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 234;

Ala, Asp, Glu, Leu, Met, Phe, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 237;

15 Asp para el aminoácido en la posición 239;

Ala, Gln o Val para el aminoácido en la posición 267;

Asn, Asp o Glu para el aminoácido en la posición 268;

Gly para el aminoácido en la posición 271;

Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 326;

20 Arg, Lys o Met para el aminoácido en la posición 330;

Ile, Leu o Met para el aminoácido en la posición 323; y

Asp para el aminoácido en la posición 296;

como lo indica la numeración EU.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 es un diagrama que muestra que un anticuerpo con unión dependiente del pH se une repetidamente a antígenos solubles. (i) Un anticuerpo se une a antígenos solubles; (ii) el anticuerpo se internaliza no específicamente en una célula mediante pinocitosis; (iii) el anticuerpo se une a FcRn dentro del endosoma y los antígenos solubles se disocian del anticuerpo; (iv) los antígenos solubles se transfieren al lisosoma y se degradan; (v) después de la disociación de los antígenos solubles, el anticuerpo se recicla al plasma a través de FcRn; (vi) el anticuerpo reciclado puede unirse de nuevo a antígenos solubles.

30 La figura 2 es un diagrama que muestra que la potenciación de la unión a FcRn en condiciones neutras da como resultado la mejora del efecto de un anticuerpo con unión dependiente del pH para unirse repetidamente a antígenos: (i) un anticuerpo se une a antígenos solubles; (ii) el anticuerpo se internaliza en una célula por pinocitosis a través de FcRn; (iii) los antígenos solubles se disocian del anticuerpo en el endosoma; (iv) los antígenos solubles se transfieren al lisosoma y se degradan; (v) después de la disociación de los antígenos solubles, el anticuerpo se recicla al plasma a través de FcRn; y (vi) el anticuerpo reciclado puede unirse de nuevo a antígenos solubles.

La figura 3 muestra un resultado del análisis SEC realizado en IgA humana agregada.

La figura 4 presenta sensogramas de Biacore que muestran la interacción de anticuerpos anti-IgA humana con IgA humana monomérica y con IgA humana agregada.

40 La figura 5 muestra el desarrollo en el tiempo de la concentración de anticuerpo en plasma en ratones normales del grupo al que se administró anticuerpo GA2-IgG1.

La figura 6 muestra el desarrollo en el tiempo de la concentración de IgA humana monomérica en plasma en ratones normales del grupo al que se administró solo IgA humana monomérica, y en ratones normales del grupo al que se administró anticuerpo GA2-IgG1 + IgA humana monomérica.

45 La figura 7 muestra el desarrollo en el tiempo de la concentración de IgA humana agregada en plasma de ratones

normales en el grupo al que se le administró solo IgA humana agregada, y en el grupo al que se le administró anticuerpo GA2-IgG1 + IgA humana agregada.

La figura 8 muestra el desarrollo en el tiempo de la "concentración de IgA humana cuando se administra IgA humana + GA2-IgG1 / concentración de IgA humana cuando solo se administra IgA humana".

- 5 La figura 9 es un diagrama que muestra un ejemplo de que un antígeno agregado se incorpora eficazmente en la célula mediante la unión a receptores de forma multivalente y fuerte mediante la formación de un gran complejo inmune mediante la unión polivalente de múltiples anticuerpos al antígeno agregado.

La figura 10 es un diagrama que muestra un ejemplo de que la incorporación de antígenos no agregados a la célula no es eficaz porque los antígenos no agregados no forman un gran complejo inmune y su unión al receptor es débil.

10 Descripción detallada

Las definiciones y la descripción detallada a continuación se proporcionan para ayudar a comprender la presente descripción.

Antígeno agregado

- 15 Como se usa en el presente documento, el antígeno agregado se refiere a una molécula en un estado en el que dos o más de una molécula (monómero) presente en un fluido biológico normal se han agregado o multimerizado. Un antígeno agregado puede ser una molécula en la que los monómeros que tienen la misma estructura tridimensional (estructura secundaria o estructura terciaria de la proteína) se agregan o multimerizan en comparación con los antígenos normalmente presentes en el fluido biológico, o puede ser una molécula en la que moléculas parcial o totalmente degeneradas están agregadas o multimerizadas en comparación con el monómero. Además, un antígeno agregado puede ser una molécula en la que una mezcla de dos está agregada o multimerizada. En los antígenos agregados, también puede estar presente otro tipo de antígeno que no se une a la molécula de unión a antígenos. Un antígeno diana de una molécula de unión a antígenos de la presente descripción no está en particular limitado siempre que el antígeno se agregue, pero se prefiere un antígeno que se agrega en una condición patológica, y se prefiere aún más un antígeno cuya forma agregada es una sustancia que causa una enfermedad. Los ejemplos de tales antígenos incluyen los antígenos que se muestran más adelante en la tabla 7. En la presente, el antígeno que se ha agregado puede denominarse antígeno agregado o antígeno multimérico.

- 30 El fluido biológico, como se usa en el presente documento, se refiere a todos los fluidos que rellenan el espacio entre la vasculatura o los tejidos/células en un organismo en el que un antígeno agregado está presente en su estado patológico. Los ejemplos específicos incluyen plasma, líquido intersticial, líquido cerebroespinal, líquido espinal, líquido de punción, líquido sinovial, líquido alveolar (líquido de lavado broncoalveolar), linfa, ascitis, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido quístico, humor acuoso (hidatoide) y similares.

- 35 Los métodos para preparar tales antígenos agregados incluyen los siguientes métodos: (1) purificar un antígeno agregado por cromatografía o similar a partir de plasma que contiene el antígeno agregado; (2) entrecruzar químicamente un antígeno monomérico mediante agentes de entrecruzamiento químico como SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo) y purificación del antígeno agregado por cromatografía o similar; y (3) purificar por cromatografía o similar un antígeno agregado formado a través de la degeneración química total o parcial de un antígeno monomérico por tratamiento térmico o tratamiento ácido.

Aminoácidos

- 40 En la presente, los aminoácidos se describen en códigos de una o tres letras o ambos, por ejemplo, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I o Val/V.

Alteración de aminoácidos

- 45 Para la alteración de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión a antígenos, pueden adoptarse de manera apropiada métodos conocidos, como los métodos de mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82:488-492)) y la PCR de extensión por solapamiento. Además, también se pueden adoptar varios métodos conocidos como métodos de alteración de aminoácidos para la sustitución de aminoácidos no naturales (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006), 35: 225-249; y Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003), 100(11):6353-6357). Por ejemplo, es adecuado utilizar un sistema de traducción sin de células (Clover Direct (Protein Express)) que contiene un ARNt que contiene un aminoácido no natural unido a un ARNt supresor ámbar complementario con el codón UAG (codón ámbar) que es uno de los codones de fin.

- 50 En la presente, el significado de la expresión "y/o" cuando describe el sitio de la alteración de aminoácidos incluye todas las combinaciones en las que "y" y "o" se combinan de forma adecuada. Específicamente, por ejemplo, "los aminoácidos en las posiciones 33, 55 y/o 96 están sustituidos" incluye la siguiente variación de alteraciones de aminoácidos:

uno o más aminoácidos en (a) posición 33; (b) posición 55; (c) posición 96; (d) posiciones 33 y 55; (e) posiciones 33

y 96; (f) posiciones 55 y 96; y (g) posiciones 33, 55 y 96.

Epítomos

"Epítopo" significa un determinante antigénico en un antígeno, y se refiere a un sitio del antígeno al que se une el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos descrita en el presente documento. Así, por ejemplo, el epítopo se puede definir según su estructura. Como alternativa, el epítopo puede definirse de acuerdo con la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos que reconoce el epítopo. Cuando el antígeno es un péptido o polipéptido, el epítopo puede especificarse mediante los restos aminoácidos que forman el epítopo. Como alternativa, cuando el epítopo es una cadena de azúcar, el epítopo puede especificarse por su estructura de cadena de azúcar específica.

Un epítopo lineal es un epítopo que contiene un epítopo cuya secuencia de aminoácidos primaria ha sido reconocida. Dicho epítopo lineal contiene típicamente al menos tres y más comúnmente al menos cinco, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 o de 6 a 20 aminoácidos en una secuencia específica.

En contraste con el epítopo lineal, un "epítopo conformacional" es un epítopo en el que la secuencia de aminoácidos primaria que contiene el epítopo no es el único determinante del epítopo reconocido (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos primaria de un epítopo conformacional no es necesariamente reconocida por un anticuerpo que define el epítopo). Los epítomos conformacionales pueden contener un mayor número de aminoácidos en comparación con los epítomos lineales. Un anticuerpo que reconoce un epítopo conformacional reconoce la estructura tridimensional de un péptido o proteína. Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega y forma una estructura tridimensional, las cadenas principales de aminoácidos y/o polipéptidos que forman un epítopo conformacional se alinean y el epítopo se hace reconocible para el anticuerpo. Los métodos para determinar las conformaciones de los epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear bidimensional, marcaje de espín específico de sitio y resonancia paramagnética de electrones, pero no se limitan a ellos. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), vol. 66, Morris (ed.).

La estructura del dominio de unión al antígeno que se une a un epítopo se denomina paratopo. Un epítopo y un paratopo se unen con estabilidad a través de la acción de enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals, enlaces hidrofóbicos y demás entre el epítopo y el paratopo. Esta fuerza de unión entre el epítopo y el paratopo se llama afinidad. La suma total de la fuerza de unión cuando se unen una pluralidad de epítomos y una pluralidad de paratopos se denomina avidéz. Cuando un anticuerpo que comprende una pluralidad de paratopos (es decir, un anticuerpo multivalente) o similar se une a una pluralidad de epítomos, la afinidad actúa de forma aditiva o sinérgica y, por lo tanto, la avidéz se vuelve más alta que la afinidad.

Actividad de unión

A continuación se describen ejemplos de un método para evaluar la unión al epítopo por una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno dirigido a un antígeno; pero un método no se limita a ello.

Por ejemplo, puede confirmarse si una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno contra un antígeno reconoce un epítopo lineal en la molécula de antígeno, por ejemplo, como se menciona a continuación. Por ejemplo, un péptido lineal que comprende una secuencia de aminoácidos que forma el antígeno se sintetiza para el propósito anterior. El péptido puede sintetizarse químicamente u obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética usando un ADNc que codifica el antígeno. Luego, se evalúa una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno hacia el antígeno para determinar su actividad de unión hacia el péptido lineal. Por ejemplo, se puede realizar un ELISA usando un péptido lineal inmovilizado como antígeno para evaluar la actividad de unión de la molécula de unión a antígenos hacia el péptido. Como alternativa, la actividad de unión hacia un péptido lineal se puede evaluar basándose en el nivel de inhibición por el péptido lineal de la unión de la molécula de unión a antígenos hacia las células que expresan en su superficie el antígeno. Estos ensayos pueden demostrar la actividad de unión de la molécula de unión a antígenos hacia el péptido lineal.

El reconocimiento de un epítopo conformacional por una molécula de unión a antígenos de ensayo que comprende un dominio de unión al antígeno dirigido a un antígeno puede confirmarse como se indica a continuación. Para el objetivo mencionado anteriormente, como se describe en el presente documento, se usa una técnica de recombinación genética general para transferir un gen recombinante que codifica un antígeno a células hospedantes (por ejemplo, células animales, células de insectos o células de levadura) que permiten la formación del epítopo conformacional nativo en el antígeno. El antígeno que contiene el epítopo conformacional se prepara a partir del cultivo de células recombinantes producidas de esta manera. El reconocimiento de un epítopo conformacional por una molécula de unión a antígenos de ensayo que comprende un dominio de unión al antígeno dirigido al antígeno se produce, por ejemplo, cuando la molécula de unión a antígenos de ensayo se une fuertemente al antígeno cuando entra en contacto con el antígeno inmovilizado que contiene el epítopo conformacional, mientras que la molécula de unión a antígenos no se une sustancialmente a un péptido lineal que comprende una secuencia de aminoácidos que constituye la secuencia de aminoácidos del antígeno inmovilizado. Como alternativa, también es posible usar, en lugar del péptido lineal mencionado anteriormente, la molécula de unión a antígenos dirigida a una IgA de ensayo que ha sido desnaturalizada por un agente reductor que escinde los enlaces disulfuro, como ditiotritol, ditiotritol, β -

mercaptoetanol, fosfinas y borohidruro de sodio y/o agentes caotrópicos tales como tensioactivos, que incluyen clorhidrato de guanidina, urea y laurilsulfato de sodio. Aquí, la expresión "no se une sustancialmente" se refiere a una actividad de unión no mayor que 80 %, normalmente no mayor que 50 %, preferiblemente no mayor que 30 %, o en particular preferiblemente no mayor que 15 % de la actividad de unión a IgA humana.

- 5 Los métodos para ensayar la actividad de unión hacia un antígeno de una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno contra el antígeno incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual* (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), 359-420). Específicamente, la evaluación se puede realizar según el principio de ELISA o EIA utilizando IgA como antígeno.

- 10 En el formato ELISA, la actividad de unión de una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno hacia el antígeno se puede evaluar cuantitativamente comparando los niveles de señales generadas por una reacción enzimática. Específicamente, se añade una molécula de unión a antígenos de ensayo a una placa ELISA sobre la cual se ha inmovilizado un antígeno. Luego, la molécula de unión a antígenos de ensayo que se une a un antígeno inmovilizado sobre la placa se detecta utilizando un anticuerpo marcado con enzima que reconoce la molécula de unión a antígenos de ensayo. En el ELISA, se puede preparar una dilución en serie de la
- 15 molécula de unión a antígenos de ensayo y se determina la titulación de unión del anticuerpo hacia un antígeno para comparar la actividad de unión de la molécula de unión a antígenos de ensayo hacia el antígeno.

La unión de una molécula de unión a antígenos de ensayo hacia un antígeno expresado en la superficie de células suspendidas en tampón o similar puede detectarse usando un citómetro de flujo. Los citómetros de flujo conocidos incluyen, por ejemplo, los siguientes dispositivos:

- 20 FACSCanto™ II
FACSAria™
FACSArray™
FACSVantage™ SE
FACSCalibur™ (todos son nombres comerciales de BD Biosciences)

- 25 EPICS ALTRA HyPerSort
Cytomics FC 500
EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (todos son nombres comerciales de Beckman Coulter).

- 30 Como alternativa, los métodos preferibles para ensayar la actividad de unión hacia un antígeno de una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno contra un antígeno incluyen, por ejemplo, el siguiente método. Primero, las células que expresan el antígeno se hacen reaccionar con una molécula de unión a antígenos de ensayo y luego se tiñe con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce la molécula que se une al antígeno. La molécula de unión a antígenos de ensayo se diluye de manera apropiada con un tampón adecuado para preparar la molécula a la concentración deseada. Por ejemplo, la molécula se puede usar a una concentración
- 35 dentro del intervalo de 10 µg/ml a 10 ng/ml. Luego, la intensidad de la fluorescencia y el recuento de células se determinan usando FACSCalibur (BD). La intensidad de fluorescencia obtenida mediante un análisis con el software CELL QUEST (BD), es decir, el valor de la media geométrica refleja la cantidad de anticuerpo unido a las células. Es decir, la actividad de unión de una molécula de unión a antígenos de ensayo, que está representada por la cantidad de molécula de unión a antígenos de ensayo unida, puede determinarse midiendo el valor de la media geométrica.

- 40 Puede evaluarse si una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión hacia un antígeno comparte un epítipo común con otra molécula de unión a antígenos basándose en la competencia entre las dos moléculas por el mismo epítipo. La competencia entre moléculas de unión a antígenos puede detectarse mediante ensayo de bloqueo cruzado o similar. Por ejemplo, el ensayo ELISA competitivo es un ensayo de bloqueo cruzado preferido.

- 45 Específicamente, en el ensayo de bloqueo cruzado, el antígeno inmovilizado en los pocillos de una placa de microtitulación se preincuban en presencia o ausencia de una molécula de unión a antígenos competidora candidata, y luego se le añade una molécula de unión a antígenos de ensayo. La cantidad de molécula de unión a antígenos de ensayo unida al antígeno en los pocillos se correlaciona indirectamente con la capacidad de unión de una molécula de unión a antígenos competidora candidata que compite por la unión al mismo epítipo. Es decir, cuanto mayor sea la afinidad de la molécula de unión a antígenos competidora por el mismo epítipo, menor será la actividad de unión
- 50 de la molécula de unión a antígenos de ensayo hacia los pocillos recubiertos de antígeno.

La cantidad de molécula de unión a antígenos de ensayo unida a los pocillos a través del el antígeno se puede determinar fácilmente marcando de antemano la molécula de unión a antígenos. Por ejemplo, una molécula de unión a antígenos marcada con biotina se mide usando un conjugado de avidina/peroxidasa y un sustrato apropiado. En particular, el ensayo

de bloqueo cruzado que utiliza marcadores de enzimas como la peroxidasa se denomina "ensayo de ELISA competitivo". La molécula de unión a antígenos también se puede marcar con otras sustancias marcadoras que permitan la detección o medición. Específicamente, se conocen radiomarcadores, marcadores fluorescentes y similares.

5 Cuando la molécula de unión a antígenos competidora candidata puede bloquear la unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos de ensayo en al menos un 20 %, preferiblemente al menos 20 a 50 %, y más preferiblemente al menos 50 % en comparación con la actividad de unión en un experimento de control realizado en ausencia de la molécula de unión a antígenos competidora candidata, se determina que la molécula de unión a antígenos de ensayo se une sustancialmente al mismo epítipo al que se une la molécula de unión a antígenos competidora, o compite por la unión al mismo epítipo.

10 Cuando ya se ha identificado la estructura de un epítipo al que se une una molécula de unión a antígenos de ensayo que contiene un dominio de unión hacia un antígeno, se puede evaluar si las moléculas de unión a antígenos de ensayo y de control comparten un epítipo común comparando las actividades de unión de las dos moléculas de unión a antígenos hacia un péptido preparado mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en el péptido que forma el epítipo.

15 Para medir las actividades de unión anteriores, por ejemplo, se comparan las actividades de unión de las moléculas de unión a antígenos de ensayo y de control hacia un péptido lineal en el que se introduce una mutación en el formato de ELISA anterior. Además de los métodos ELISA, la actividad de unión hacia el péptido mutante unido a una columna se puede determinar haciendo pasar las moléculas de unión a antígenos de ensayo y control a través de la columna, y luego cuantificando la molécula de unión a antígenos eluida en la disolución de elución. Se conocen métodos para adsorber un péptido mutante a una columna, por ejemplo, en forma de péptido de fusión de GST.

20 Como alternativa, cuando el epítipo identificado en una molécula de unión a antígenos expresada sobre una célula es un epítipo conformacional, se puede evaluar si las moléculas de unión a antígenos de ensayo y de control comparten un epítipo común, por ejemplo, mediante el siguiente método. Primero, se preparan células que expresan un antígeno de interés y células que expresan un antígeno con una mutación introducida en el epítipo. Las moléculas de unión a antígenos de ensayo y control se añaden a una suspensión celular preparada suspendiendo estas células en un tampón apropiado, como PBS. A continuación, las suspensiones de células se lavan de forma apropiada con un tampón y se les añade un anticuerpo marcado con FITC que reconoce las moléculas de unión a antígenos de ensayo y de control. La intensidad de la fluorescencia y el número de células teñidas con el anticuerpo marcado se determinan usando FACSCalibur (BD). Las moléculas de unión a antígenos de ensayo y de control se diluyen apropiadamente usando un tampón adecuado y se usan a las concentraciones deseadas. Por ejemplo, se pueden usar a una concentración dentro del intervalo de 10 µg/ml a 10 ng/ml. La intensidad de fluorescencia determinada por un análisis con el software CELL QUEST (BD), es decir, el valor de la media geométrica, refleja la cantidad de anticuerpo marcado unido a las células. Es decir, las actividades de unión de las moléculas de unión a antígenos de ensayo y control, que están representadas por la cantidad de anticuerpo marcado unido, pueden determinarse midiendo el valor de la media geométrica.

Se puede confirmar si la actividad de unión a un antígeno agregado es mayor que la actividad de unión a un antígeno no agregado comparando la actividad de unión al antígeno agregado y la actividad de unión al antígeno no agregado según el método descrito anteriormente.

Dominio de unión al antígeno

40 En la presente, un "dominio de unión al antígeno" puede ser de cualquier estructura siempre que se una a un antígeno de interés. Dichos dominios preferiblemente incluyen, por ejemplo:

regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos;

un módulo de aproximadamente 35 aminoácidos llamado dominio A que está contenido en la proteína de la membrana celular *in vivo* Avimer (Publicación Internacional n.º WO 2004/044011, Publicación Internacional n.º WO 2005/040229);

45 adnectina que contiene el dominio 10Fn3 que se une al resto proteico de fibronectina, una glicoproteína expresada sobre la membrana celular (Publicación Internacional n.º WO 2002/032925);

aficuerpo que está compuesto por un haz de tres hélices de 58 aminoácidos basado en el andamiaje del dominio de unión a IgG de la Proteína A (Publicación Internacional n.º WO 1995/001937);

50 proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) que son una región expuesta en la superficie molecular de repeticiones de anquirina (AR) que tienen una estructura en la que una subunidad que consta de una vuelta que comprende 33 restos aminoácidos, dos hélices antiparalelas y un bucle se apila repetidamente (Publicación internacional n.º WO 2002/020565);

55 anticlinas y similares, que son dominios que constan de cuatro bucles que sostienen un lado de una estructura de barril compuesta de ocho hebras antiparalelas dispuestas circularmente que están altamente conservadas entre las moléculas de lipocalina, como la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) (Publicación Internacional

n.º WO 2003/029462); y

la región cóncava formada por la estructura de láminas paralelas dentro de la estructura en forma de herradura constituida por repeticiones apiladas del módulo de repetición rico en leucina (LRR) del receptor de linfocitos variable (VLR) que no tiene la estructura de inmunoglobulina y se utiliza en el sistema de inmunidad adquirida en vertebrados sin mandíbula como la lamprea y el mixino (Publicación Internacional n.º WO 2008/016854). Los dominios de unión al antígeno preferidos incluyen, por ejemplo, aquellos que tienen regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos. Los ejemplos preferidos de dominios de unión al antígeno incluyen "Fv monocatenario (scFv)", "anticuerpo monocatenario", "Fv", "Fv 2 monocatenario (scFv2)", "Fab" y "F(ab')₂".

Complejo inmunológico

- 10 El complejo inmunológico se refiere a una estructura producida cuando al menos un antígeno no agregado o un antígeno agregado y al menos una molécula de unión a antígenos se unen entre sí para formar un complejo de mayor peso molecular que consta de uno o más antígenos y de una o más moléculas de unión a antígenos.

Anticuerpo

- 15 En la presente, "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina natural o una inmunoglobulina producida por síntesis parcial o completa. Los anticuerpos pueden aislarse a partir de fuentes naturales, tales como plasma y suero de origen natural, o sobrenadantes de cultivos de hibridomas productores de anticuerpos. Como alternativa, los anticuerpos se pueden sintetizar parcial o completamente usando técnicas como la recombinación genética. Los anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos de un isotipo de inmunoglobulina o de una subclase perteneciente al mismo. Las inmunoglobulinas humanas conocidas incluyen anticuerpos de las siguientes nueve clases (isotipos):
20 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM. De estos isotipos, los anticuerpos de la presente descripción incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se describen varias secuencias de alotipos de regiones constantes de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana debidas a polimorfismos génicos en "Sequences of proteins of immunological interest", publicación de NIH n.º 91-3242. Cualquiera de dichas secuencias puede usarse como se describe en este documento. En particular, para la secuencia de IgG1 humana, la secuencia de aminoácidos en las
25 posiciones 356 a 358 como se indica mediante la numeración EU puede ser DEL o EEM. Se han descrito varias secuencias de alotipos debidos a polimorfismos genéticos en "Sequences of proteins of immunological interest", publicación de NIH n.º 91-3242 para la región constante de Igκ humana (Kappa) y la región constante de Igλ humana (Lambda), y cualquiera de las secuencias puede usarse como se describe en este documento.

Los expertos en la técnica conocen métodos para producir un anticuerpo con la actividad de unión deseada.

- 30 Los anticuerpos se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales usando métodos conocidos. Los anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen anticuerpos producidos por hibridomas o células hospedantes transformadas con un vector de expresión que porta un gen de anticuerpo mediante técnicas de ingeniería genética. Por otra parte, los "anticuerpos humanizados" o "anticuerpos quiméricos" se incluyen en los anticuerpos monoclonales descritos en este documento.
35 Pueden producirse hibridomas productores de anticuerpos monoclonales usando técnicas conocidas, por ejemplo, como se describe a continuación. Específicamente, los mamíferos se inmunizan mediante métodos de inmunización convencionales utilizando un antígeno sensibilizante. Las células inmunes resultantes se fusionan con células progenitoras conocidas mediante métodos convencionales de fusión celular. Entonces, los hibridomas que producen un anticuerpo de interés pueden seleccionarse mediante la selección de células productoras de anticuerpos
40 monoclonales usando métodos de selección convencionales. No existe una limitación particular sobre los mamíferos a inmunizar con el antígeno sensibilizante. Sin embargo, es preferible seleccionar los mamíferos considerando su compatibilidad con las células progenitoras que se utilizarán para la fusión celular. En general, se utilizan preferiblemente roedores tales como ratones, ratas y hámsteres, conejos y monos.

- Los animales anteriores se inmunizan con un antígeno sensibilizante mediante métodos conocidos. Los métodos de
45 inmunización realizados generalmente incluyen, por ejemplo, inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno sensibilizador en mamíferos. Específicamente, un antígeno sensibilizante se diluye apropiadamente con PBS (disolución salina tamponada con fosfato), disolución salina fisiológica o similar. Si se desea, se mezcla un adyuvante convencional tal como el adyuvante completo de Freund con el antígeno y se emulsiona la mezcla. Luego, el antígeno sensibilizante se administra a un mamífero varias veces a intervalos de 4 a 21 días. Se pueden usar vehículos
50 apropiados en la inmunización con el antígeno sensibilizante. En particular, cuando se usa un péptido parcial de bajo peso molecular como antígeno sensibilizante, a veces es deseable acoplar el péptido antigénico sensibilizante a una proteína portadora tal como albúmina o hemocianina de lapa californiana para inmunización.

- Como alternativa, pueden prepararse hibridomas que producen un anticuerpo deseado usando una inmunización con ADN como se menciona a continuación. La inmunización con ADN es un método de inmunización que confiere
55 inmunoestimulación al expresar un antígeno sensibilizante en un animal inmunizado como resultado de la administración de un ADN de vector construido para permitir la expresión de un gen que codifica la proteína del antígeno en el animal. En comparación con los métodos de inmunización convencionales en los que se administra un antígeno proteico a los animales que se van a inmunizar, se espera que la inmunización con ADN sea mejor en lo siguiente:

- en el caso de que el antígeno sea una proteína de membrana, se puede proporcionar inmunoestimulación mientras se mantiene la estructura de la proteína de membrana; y
- no es necesario purificar el antígeno para la inmunización.

Para preparar un anticuerpo monoclonal usando una inmunización con ADN, en primer lugar, se administra un ADN que expresa una proteína antigénica a un animal que se va a inmunizar. El ADN que codifica la proteína del antígeno se puede sintetizar mediante métodos conocidos tales como PCR. El ADN obtenido se inserta en un vector de expresión apropiado y luego se administra a un animal que se va a inmunizar. Los vectores de expresión usados preferiblemente incluyen, por ejemplo, vectores de expresión disponibles en el mercado, tales como pADNc3.1. Los vectores se pueden administrar a un organismo usando métodos convencionales. Por ejemplo, la inmunización con ADN se realiza utilizando una pistola de genes para introducir partículas de oro recubiertas con el vector de expresión en las células del cuerpo de un animal que se va a inmunizar.

Después de inmunizar a un mamífero como se describió anteriormente, se confirma en el suero un aumento en la titulación de un anticuerpo contra un antígeno deseado. Luego, las células inmunes se recolectan del mamífero y luego se someten a fusión celular. En particular, se usan preferiblemente esplenocitos como células inmunes.

Se usa una célula de mieloma de mamífero como una célula que se fusionará con las células inmunes mencionadas anteriormente. Las células de mieloma comprenden preferiblemente un marcador de selección adecuado para la selección. Un marcador de selección confiere características a las células para su supervivencia (o muerte) en una condición de cultivo específica. La deficiencia de hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (de aquí en adelante abreviada como deficiencia de HGPRT) y la deficiencia de timidina quinasa (de aquí en adelante abreviada como deficiencia de TK) se conocen como marcadores de selección. Las células con deficiencia de HGPRT o TK tienen sensibilidad a hipoxantina-aminopterina-timidina (de aquí en adelante abreviada como sensibilidad a HAT). Las células sensibles a HAT no pueden sintetizar ADN en un medio de selección de HAT y, por tanto, mueren. Sin embargo, cuando las células se fusionan con células normales, pueden continuar la síntesis de ADN utilizando la vía de rescate de las células normales y, por lo tanto, pueden crecer incluso en el medio de selección de HAT.

Las células deficientes en HGPRT y deficientes en TK pueden seleccionarse en un medio que contenga 6-tioguanina, 8-azaguanina (de aquí en adelante abreviadas como 8AG) o 5'-bromodesoxiuridina, respectivamente. Las células normales mueren porque incorporan estos análogos de pirimidina en su ADN. Por otra parte, las células que son deficientes en estas enzimas pueden sobrevivir en el medio de selección, ya que no pueden incorporar estos análogos de pirimidina. Además, un marcador de selección denominado resistencia a G418 proporcionado por el gen de resistencia a la neomicina confiere resistencia a los antibióticos de 2-desoxiestreptamina (análogos de gentamicina). Se conocen varios tipos de células de mieloma que son adecuadas para la fusión celular.

Por ejemplo, se pueden usar preferiblemente células de mieloma que incluyen las siguientes células:

P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979), 123 (4), 1548-1550);

P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978), 81, 1-7);

NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976,) 6 (7), 511-519);

MPC-11 (Cell (1976), 8 (3), 405-415);

SP2/0 (Nature (1978), 276 (5685), 269-270);

FO (J. Immunol. Métodos (1980), 35 (1-2), 1-21);

S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978), 148 (1), 313-323);

R210 (Nature (1979), 277 (5692), 131-133), etc.

Las fusiones de células entre los inmunocitos y las células de mieloma se llevan a cabo esencialmente usando métodos conocidos, por ejemplo, un método de Kohler y Milstein *et al.* (Methods Enzymol. (1981), 73: 3-46).

Más específicamente, la fusión celular se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un medio de cultivo convencional en presencia de un agente promotor de la fusión celular. Los agentes promotores de la fusión incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) y virus Sendai (HVJ). Si es necesario, también se agrega una sustancia auxiliar, como sulfóxido de dimetilo, para mejorar la eficacia de la fusión.

La proporción de células inmunes a células de mieloma se puede determinar a discreción propia, preferiblemente, por ejemplo, una célula de mieloma por cada uno a diez inmunocitos. Los medios de cultivo que se utilizarán para las fusiones celulares incluyen, por ejemplo, medios que son adecuados para el crecimiento de líneas celulares de mieloma, como el medio RPMI1640 y el medio MEM, y otros medios de cultivo convencionales utilizados para este tipo de cultivo celular. Además, se pueden añadir preferiblemente al medio de cultivo suplementos de suero, como suero de ternero fetal (FCS).

Para la fusión celular, se mezclan bien cantidades predeterminadas de las células inmunes y las células de mieloma anteriores en el medio de cultivo anterior. A continuación, se le añade una disolución de PEG (por ejemplo, el peso molecular promedio es de aproximadamente 1000 a 6000) precalentada hasta aproximadamente 37 °C a una concentración de generalmente 30 % a 60 % (en p/v). Esto se mezcla suavemente para producir las células de fusión deseadas (hibridomas). Luego, se agrega gradualmente a las células un medio de cultivo apropiado mencionado anteriormente, y esto se centrifuga repetidamente para eliminar el sobrenadante. Por tanto, se pueden eliminar los agentes de fusión celular y similares que son desfavorables para el crecimiento de hibridomas.

Los hibridomas así obtenidos pueden seleccionarse mediante cultivo usando un medio selectivo convencional, por ejemplo, medio HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Las células distintas de los hibridomas deseados (células no fusionadas) pueden destruirse mediante cultivo continuo en el medio HAT anterior durante un período de tiempo suficiente (típicamente, el período es de varios días a varias semanas). Luego, los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se seleccionan y se clonan individualmente mediante métodos convencionales de dilución limitante.

Los hibridomas así obtenidos pueden seleccionarse utilizando un medio de selección basado en el marcador de selección que posee el mieloma utilizado para la fusión celular. Por ejemplo, las células deficientes en HGPRT o TK pueden seleccionarse mediante cultivo usando el medio HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Específicamente, cuando se utilizan células de mieloma sensibles a HAT para la fusión celular, las células fusionadas con éxito con células normales pueden proliferar selectivamente en el medio HAT. Las células distintas de los hibridomas deseados (células no fusionadas) se pueden matar mediante cultivo continuo en el medio HAT anterior durante un período de tiempo suficiente. Específicamente, los hibridomas deseados pueden seleccionarse mediante cultivo durante generalmente varios días a varias semanas. Luego, los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se seleccionan y se clonan individualmente mediante métodos convencionales de dilución limitante.

Los anticuerpos deseados pueden seleccionarse preferiblemente y clonarse individualmente mediante métodos de selección basados en una reacción conocida de antígeno/anticuerpo. Por ejemplo, la actividad de un anticuerpo para unirse al antígeno inmovilizado se puede evaluar basándose en el principio de ELISA. Por ejemplo, el antígeno se inmoviliza en los pocillos de una placa de ELISA. Los sobrenadantes de cultivo de hibridomas se ponen en contacto con la IgA en los pocillos y se detectan los anticuerpos que se unen a la IgA. Cuando los anticuerpos monoclonales se derivan de un ratón, los anticuerpos unidos a las células pueden detectarse utilizando un anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón. Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado que tiene la capacidad de unión a antígenos se seleccionan mediante la selección anterior, y pueden clonarse mediante un método de dilución limitante o similar.

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales así preparados pueden transferirse en un medio de cultivo convencional y almacenarse en nitrógeno líquido durante un período prolongado.

Los hibridomas anteriores se cultivan mediante un método convencional y los anticuerpos monoclonales deseados se pueden preparar a partir de los sobrenadantes del cultivo. Como alternativa, los hibridomas se administran y se cultivan en mamíferos compatibles y se preparan anticuerpos monoclonales a partir de la ascitis. El primer método es adecuado para preparar anticuerpos con alta pureza.

También se pueden usar preferiblemente anticuerpos codificados por genes de anticuerpos que se clonan a partir de células productoras de anticuerpos tales como los hibridomas anteriores. Se inserta un gen de anticuerpo clonado en un vector apropiado, y este se introduce en un hospedante para expresar el anticuerpo codificado por el gen. Ya han sido establecidos métodos para aislar genes de anticuerpos, insertar los genes en vectores y transformar las células hospedante, por ejemplo, por Vandamme *et al.* (Eur. J. Biochem. (1990), 192 (3), 767-775.). Los métodos para producir anticuerpos recombinantes también se conocen, como se describe a continuación.

Por ejemplo, se prepara un ADNc que codifica la región variable (región V) de un anticuerpo de interés a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo. Para ello, primero se extrae el ARN total de los hibridomas. Los métodos utilizados para extraer ARNm de las células incluyen, por ejemplo:

- el método de ultracentrifugación de guanidina (Biochemistry (1979), 18 (24), 5294-5299), y
- el método AGPC (Anal. Biochem. (1987), 162 (1), 156-159).

Los ARNm extraídos se pueden purificar utilizando el kit de purificación de ARNm (GE Healthcare Bioscience) o similar. Como alternativa, los kits para extraer el ARNm total directamente de las células, como el kit de purificación de ARNm QuickPrep (GE Healthcare Bioscience), también están disponibles comercialmente. Los ARNm se pueden preparar a partir de hibridomas usando tales kits. Los ADNc que codifican la región V del anticuerpo pueden sintetizarse a partir de los ARNm preparados usando una transcriptasa inversa. Los ADNc se pueden sintetizar usando el kit de síntesis de ADNc de primera hebra de transcriptasa inversa AMV (Seikagaku Co.) o similar. Además, se pueden utilizar el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech) y el método 5'-RACE basado en PCR (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85 (23), 8998-9002; Nucleic Acid Res. (1989), 17 (8), 2919-2932) de forma apropiada para sintetizar y amplificar ADNc. En dicho proceso de síntesis de ADNc, pueden introducirse sitios de enzimas de restricción

apropiados descritos a continuación en ambos extremos de un ADNc.

El fragmento de ADNc de interés se purifica a partir del producto de PCR resultante y luego se acopla a un vector de ADN. Por tanto, se construye un vector recombinante y se introduce en *E. coli* o similar. Después de la selección de colonias, el vector recombinante deseado se puede preparar a partir de *E. coli* formadores de colonias. Luego, se ensaya si el vector recombinante tiene la secuencia de nucleótidos de ADNc de interés mediante un método conocido, tal como el método de terminación de cadena de didesoxinucleótidos.

El método 5'-RACE que usa cebadores para amplificar el gen de la región variable se usa convenientemente para aislar el gen que codifica la región variable. En primer lugar, se construye un banco de ADNc de 5'-RACE mediante síntesis de ADNc utilizando ARN extraídos de células de hibridoma como molde. De modo apropiado, se usa un kit disponible en el mercado, como el kit de amplificación de ADNc SMART RACE, para sintetizar el banco de ADNc de 5'-RACE.

El gen del anticuerpo se amplifica mediante PCR utilizando el banco de ADNc de 5'-RACE preparado como molde. Los cebadores para amplificar el gen del anticuerpo de ratón pueden diseñarse basándose en secuencias conocidas del gen del anticuerpo. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores varían según la subclase de inmunoglobulina. Por lo tanto, es preferible que la subclase se determine de antemano usando un kit disponible en el mercado, como el kit de isotipificación de anticuerpos monoclonales de ratón Iso Strip (Roche Diagnostics).

Específicamente, por ejemplo, se utilizan cebadores que permiten la amplificación de genes que codifican las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y $\gamma 3$ y las cadenas ligeras κ y λ para aislar genes que codifican una IgG de ratón. En general, se usa un cebador que se asocia con un sitio de región constante cercano a la región variable como cebador del lado 3' para amplificar un gen de región variable de IgG. Por otra parte, se usa un cebador unido a un kit de construcción de bancos de ADNc de RACE 5' como cebador del lado 5'.

Los productos de PCR así amplificados se utilizan para remodelar inmunoglobulinas compuestas por una combinación de cadenas pesadas y ligeras. Puede seleccionarse un anticuerpo deseado usando la actividad de unión al antígeno de una inmunoglobulina remodelada como indicador. Por ejemplo, cuando el objetivo es aislar un anticuerpo contra un antígeno deseado, se prefiere más que la unión del anticuerpo al antígeno sea específica. Un anticuerpo que se une al antígeno se puede seleccionar, por ejemplo, mediante las siguientes etapas:

(1) poner en contacto un antígeno deseado con un anticuerpo que comprende la región V codificada por un ADNc aislado de un hibridoma;

(2) detectar la unión del anticuerpo al antígeno; y

(3) seleccionar un anticuerpo que se una a la célula que expresa el antígeno.

Se conocen métodos para detectar la unión de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, la unión de un anticuerpo a células que expresan antígenos puede detectarse mediante las técnicas descritas anteriormente, tales como ELISA.

Los métodos de selección de anticuerpos preferidos que utilizan la actividad de unión como indicador también incluyen métodos de inmunoadsorción que utilizan vectores de fagos. Los métodos de selección que utilizan vectores de fagos son ventajosos cuando los genes de anticuerpos se aíslan de bancos de subclases de cadenas pesadas y cadenas ligeras de una población de células que expresan anticuerpos policlonales. Los genes que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera pueden unirse mediante una secuencia conectora apropiada para formar un Fv monocatenario (scFv). Pueden producirse fagos que presentan scFv en su superficie insertando un gen que codifica un scFv en un vector de fago. Los fagos se ponen en contacto con un antígeno de interés. Entonces, se puede aislar un ADN que codifica un scFv que tiene la actividad de unión de interés recolectando los fagos unidos al antígeno. Este proceso puede repetirse según sea necesario para enriquecer en scFv que tengan la actividad de unión de interés.

Después del aislamiento del ADNc que codifica la región V del anticuerpo de interés, el ADNc se digiere con enzimas de restricción que reconocen los sitios de restricción introducidos en ambos extremos del ADNc. Las enzimas de restricción preferidas reconocen y escinden una secuencia de nucleótidos que aparece en la secuencia de nucleótidos del gen del anticuerpo a baja frecuencia. Además, se introduce preferiblemente un sitio de restricción para una enzima que produce un extremo pegajoso en un vector para insertar un fragmento digerido de una sola copia en la orientación correcta. El ADNc que codifica la región V del anticuerpo se digiere como se describió anteriormente, y este se inserta en un vector de expresión apropiado para construir un vector de expresión de anticuerpo. En este caso, si un gen que codifica la región constante del anticuerpo (región C) y un gen que codifica la región V anterior se condensan dentro de marco, se obtiene un anticuerpo quimérico. En la presente, "anticuerpo quimérico" significa que el origen de la región constante es diferente del de la región variable. Por tanto, además de los anticuerpos heteroquiméricos de ratón-humano, se incluyen anticuerpos aloquiméricos humano-humano en los anticuerpos quiméricos descritos en este documento. Puede construirse un vector de expresión de anticuerpo quimérico insertando el gen de la región V anterior en un vector de expresión que ya tiene la región constante. Específicamente, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción que escinde el gen de la región V anterior puede colocarse apropiadamente en el lado 5' de un vector de expresión que porta un ADN que codifica una región constante de anticuerpo deseada (región C). Se construye un vector de expresión de anticuerpo quimérico condensado dentro de

marco los dos genes digeridos con la misma combinación de enzimas de restricción.

Para producir un anticuerpo monoclonal, los genes del anticuerpo se insertan en un vector de expresión de modo que los genes se expresen bajo el control de una región reguladora de la expresión. La región reguladora de la expresión para la expresión de anticuerpos incluye, por ejemplo, potenciadores y promotores. Además, se puede unir una secuencia señal apropiada al extremo amino de modo que el anticuerpo expresado se secrete hacia el exterior de las células. El polipéptido expresado se escinde en el extremo carboxilo terminal de la secuencia anterior, y el polipéptido resultante se secreta hacia el exterior de las células como un polipéptido maduro. Luego, las células hospedantes apropiadas se transforman con el vector de expresión y se obtienen células recombinantes que expresan el ADN que codifica un anticuerpo deseado.

Los ADN que codifican la cadena pesada (cadena H) y la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo se insertan por separado en diferentes vectores de expresión para expresar el gen del anticuerpo. Puede expresarse una molécula de anticuerpo que contiene las cadenas H y L cotransfectando la misma célula hospedante con vectores en los que se insertan los genes de cadena H y cadena L, respectivamente. Como alternativa, las células hospedantes se pueden transformar con un solo vector de expresión en el que se insertan los ADN que codifican las cadenas H y L (ver la Publicación Internacional n.º WO 1994/011523).

Existen varias combinaciones de células hospedante/vector de expresión conocidas para la preparación de anticuerpos mediante la introducción de genes de anticuerpos aislados en hospedantes apropiados. Todos estos sistemas de expresión son aplicables al aislamiento de las moléculas de unión a antígenos descritas en el presente documento. Las células eucariotas apropiadas utilizadas como células hospedantes incluyen células animales, células vegetales y células fúngicas. Específicamente, las células animales incluyen, por ejemplo, las siguientes células.

(1) Células de mamíferos: CHO (línea celular de ovario de hámster chino), COS (línea celular de riñón de mono), mieloma (Sp2/O, NS0, etc.), BHK (línea celular de riñón de cría de hámster), HEK293 (línea celular de riñón embrionario humano con cizallamiento de ADN de adenovirus (Ad)5), células PER.C6 (línea celular retiniana embrionaria humana transformada con los genes E1A y E1B de adenovirus tipo 5 (Ad5)), Hela, Vero o similares (Current Protocols in Protein Science (mayo de 2001, unidad 5.9, tabla 5.9.1)).

(2) Células de anfibios: ovocitos de *Xenopus* o similares.

(3) Células de insectos: sf9, sf21, Tn5 o similares.

Además, como célula vegetal, se conoce un sistema de expresión de genes de anticuerpos que utiliza células derivadas del género *Nicotiana*, tal como *Nicotiana tabacum*. Las células cultivadas de callos se pueden usar apropiadamente para transformar células vegetales.

Además, las siguientes células se pueden utilizar como células fúngicas:

levaduras: el género *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, y el género *Pichia*, tal como *Pichia pastoris*; y

hongos filamentosos: el género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Además, también se conocen sistemas de expresión de genes de anticuerpos que utilizan células procariotas. Por ejemplo, cuando se utilizan células bacterianas, células de *E. coli*, células de *Bacillus subtilis* y similares, estas pueden utilizarse adecuadamente como se describe en este documento. Los vectores de expresión que portan los genes de anticuerpos de interés se introducen en estas células mediante transfección. Las células transfectadas se cultivan *in vitro*, y el anticuerpo deseado se puede preparar a partir del cultivo de células transformadas.

Además de las células hospedantes descritas anteriormente, también se pueden usar animales transgénicos para producir un anticuerpo recombinante. Es decir, el anticuerpo se puede obtener de un animal en el que se introduce el gen que codifica el anticuerpo de interés. Por ejemplo, el gen del anticuerpo se puede construir como un gen de fusión insertándolo dentro de marco en un gen que codifica una proteína producida específicamente en la leche. Puede usarse β -caseína de cabra o similar, por ejemplo, como proteína secretada en la leche. Los fragmentos de ADN que contienen el gen condensado insertado con el gen del anticuerpo se inyectan en un embrión de cabra, y luego este embrión se introduce en una cabra hembra. Los anticuerpos deseados se pueden obtener como una proteína condensada con la proteína de la leche de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra receptora del embrión (o su progenie). Además, para aumentar el volumen de la leche que contiene el anticuerpo deseado producido por la cabra transgénica, se pueden administrar hormonas a la cabra transgénica según sea necesario (Ebert, K. M. *et al.*, Bio/Technology (1994), 12(7): 699-702).

Cuando una molécula de unión a antígenos descrita en el presente documento se administra a un ser humano, puede usarse apropiadamente un dominio de unión al antígeno derivado de un anticuerpo genéticamente recombinante que ha sido modificado artificialmente para reducir la antigenicidad heteróloga contra humanos y similares como el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión a antígenos. Dichos anticuerpos genéticamente recombinantes incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos modificados se producen de forma apropiada mediante métodos conocidos.

Una región variable de anticuerpo usada para producir el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos descrita en el presente documento generalmente está formada por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que están separadas por cuatro regiones marco (FR). La CDR es una región que determina sustancialmente la especificidad de unión de un anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos de las CDR son muy diversas. Por otro lado, las secuencias de aminoácidos que forman las FR a menudo tienen una alta identidad incluso entre anticuerpos con diferentes especificidades de unión. Por lo tanto, generalmente, la especificidad de unión de un determinado anticuerpo puede introducirse en otro anticuerpo mediante injerto de CDR.

Un anticuerpo humanizado también se denomina anticuerpo humano remodelado. Específicamente, se conocen anticuerpos humanizados preparados mediante la aplicación de la tecnología de injerto de CDR, que injerta las CDR de un anticuerpo de un animal no humano, como un anticuerpo de ratón, a un anticuerpo humano, etc. También se conocen técnicas de ingeniería genética habituales para obtener anticuerpos humanizados. Específicamente, por ejemplo, se conoce la PCR de extensión por solapamiento como un método para injertar una CDR de anticuerpo de ratón a una FR humana. En la PCR de extensión por solapamiento, se añade una secuencia de nucleótidos que codifica una CDR de un anticuerpo de ratón que se va a injertar a los cebadores para sintetizar una FR de un anticuerpo humano. Se preparan cebadores para cada una de las cuatro FR. Generalmente se considera que cuando se injerta una CDR de ratón a una FR humana, la selección de una FR humana que tenga una alta identidad con una FR de ratón es ventajosa para mantener la función de la CDR. Es decir, generalmente es preferible usar una FR humana que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga una alta identidad con la secuencia de aminoácidos de la FR adyacente a la CDR de ratón que se va a injertar.

Las secuencias de nucleótidos que se van a acoplar se diseñan de modo que se conecten entre sí en el marco. Las FR humanas se sintetizan individualmente utilizando los respectivos cebadores. Como resultado, se obtienen productos en los que el ADN que codifica la CDR de ratón se une a los ADN que codifican las FR individuales. Las secuencias de nucleótidos que codifican la CDR de ratón de cada producto se diseñan de modo que se solapen entre sí. Luego, se lleva a cabo una reacción de síntesis de la cadena complementaria para asociar las regiones CDR superpuestas de los productos sintetizados usando un gen de anticuerpo humano como molde. Las FR humanas se acoplan a través de las secuencias de CDR de ratón mediante esta reacción.

El gen de la región V de longitud completa, en el que, en último término, se acoplan tres CDR y cuatro FR, se amplifica utilizando cebadores que se asocian a su extremo 5' o 3', que se añaden con secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas. Puede producirse un vector de expresión para un anticuerpo humanizado insertando el ADN obtenido como se describió anteriormente y un ADN que codifica una región C de un anticuerpo humano en un vector de expresión para que se acoplen dentro de marco. Después de que el vector recombinante se transfecte en un hospedante para establecer células recombinantes, las células recombinantes se cultivan y el ADN que codifica el anticuerpo humanizado se expresa para producir el anticuerpo humanizado en el cultivo celular (ver, Publicación de Patente Europea n.º EP 239400 y Publicación de Patente Internacional n.º WO 1996/002576).

Midiendo y evaluando cualitativa o cuantitativamente la actividad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado producido como se describió anteriormente se pueden seleccionar adecuadamente las FR de anticuerpos humanos que permiten que las CDR formen un sitio de unión al antígeno favorable cuando se acoplan a través de las CDR. Los restos aminoácidos en las FR pueden sustituirse según sea necesario, de modo que las CDR de un anticuerpo humano reformado formen un sitio de unión al antígeno apropiado. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones en la secuencia de aminoácidos en las FR aplicando el método de PCR utilizado para injertar una CDR de ratón en una FR humana. Más específicamente, se pueden introducir mutaciones de secuencia de nucleótidos parciales en cebadores que se hibridan con la FR. Las mutaciones de la secuencia de nucleótidos se introducen en las FR sintetizadas utilizando tales cebadores. Las secuencias de FR mutantes que tienen las características deseadas se pueden seleccionar midiendo y evaluando la actividad del anticuerpo mutante con aminoácidos sustituidos para unirse al antígeno mediante el método mencionado anteriormente (Cancer Res. (1993), 53: 851-856).

Como alternativa, los anticuerpos humanos deseados se pueden obtener inmunizando animales transgénicos que contienen todo el repertorio de genes de anticuerpos humanos (véanse las publicaciones internacionales n.ºs WO 1993/012227; WO 1992/003918; WO 1994/002602; WO 1994/025585; WO 1996/034096; WO 1996/033735) por inmunización con ADN.

Además, también se conocen técnicas para preparar anticuerpos humanos mediante inmunoabsorción usando bancos de anticuerpos humanos. Por ejemplo, la región V de un anticuerpo humano se expresa como un anticuerpo monocatenario (scFv) en la superficie de un fago mediante el método de presentación de fagos. Pueden seleccionarse los fagos que expresan un scFv que se une al antígeno. La secuencia de ADN que codifica la región V del anticuerpo humano que se une al antígeno se puede determinar analizando los genes de los fagos seleccionados. Se determina la secuencia de ADN del scFv que se une al antígeno. Se prepara un vector de expresión condensando la secuencia de la región V en marco con la secuencia de la región C de un anticuerpo humano deseado, e insertándolas en un vector de expresión apropiado. El vector de expresión se introduce en células apropiadas para la expresión como las descritas anteriormente. El anticuerpo humano puede producirse expresando el gen que codifica el anticuerpo humano en las células. Estos métodos ya se conocen (véanse las publicaciones internacionales n.ºs WO 1992/001047; WO 1992/020791; WO 1993/006213; WO 1993/011236; WO 1993/019172; WO 1995/001438; WO 1995/015388).

Además de las técnicas descritas anteriormente, se puede utilizar de forma apropiada técnicas de clonación de células B (identificación de cada secuencia que codifica el anticuerpo, clonación y su aislamiento; uso en la construcción del vector de expresión para preparar cada anticuerpo (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en particular); y similares) como se describe en Bernasconi *et al.* (Science (2002), 298: 2199-2202) o en la Publicación Internacional n.º WO 2008/081008, para aislar genes de anticuerpos.

Numeración UE y numeración Kabat

De acuerdo con los métodos usados en la presente descripción, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDR y FR del anticuerpo se especifican de acuerdo con la numeración de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). En este caso, cuando una molécula de unión a antígenos es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, los aminoácidos de la región variable se indican según el sistema de numeración de Kabat (numeración de Kabat), mientras que los aminoácidos de la región constante se indican según el sistema de numeración EU basado en las posiciones de los aminoácidos de Kabat.

Condiciones de concentración de iones

Condiciones de concentración de iones metálicos

En una realización, la concentración de iones se refiere a una concentración de iones metálicos. Los "iones metálicos" se refieren a los iones de los elementos del grupo I, excepto el hidrógeno, como los metales alcalinos y los elementos del grupo del cobre, los elementos del grupo II, como los metales alcalinotérreos y los elementos del grupo del zinc, los elementos del grupo III, excepto el boro, los elementos del grupo IV, excepto el carbono y el silicio, los elementos del grupo VIII, como los elementos del grupo del hierro y del grupo del platino, elementos pertenecientes al subgrupo A de los grupos V, VI y VII, y elementos metálicos, como antimonio, bismuto y polonio. Los átomos de metales tienen la propiedad de liberar electrones de valencia para convertirse en cationes. Esto se conoce como tendencia a la ionización. Los metales con fuerte tendencia a la ionización se consideran químicamente activos.

En la presente invención, un ion metálico preferido es el ion calcio. El ion calcio participa en la modulación de muchos fenómenos biológicos, incluida la contracción de músculos, como los músculos esquelético, liso y cardíaco; la activación del movimiento, la fagocitosis y similares, de leucocitos; la activación del cambio de forma, la secreción y similares, de las plaquetas; la activación de linfocitos; la activación de mastocitos, incluida la secreción de histamina; las respuestas celulares mediadas por el receptor de catecolamina α o el receptor de acetilcolina; la exocitosis; la liberación de sustancias transmisoras desde terminales neuronales; y el flujo axoplásmico en neuronas. Los receptores de iones calcio intracelulares conocidos incluyen troponina C, calmodulina, parvalbúmina y cadena ligera de miosina, que tienen varios sitios de unión de iones calcio y se cree que se derivan de un origen común en términos de evolución molecular. También hay muchos motivos de unión al calcio conocidos. Dichos motivos bien conocidos incluyen, por ejemplo, dominios de cadherina, mano EF de calmodulina, dominio C2 de la proteína quinasa C, dominio Gla de la proteína de coagulación sanguínea factor IX, lectinas de tipo C del receptor de asialoglicoproteína y receptor de unión a manosa, dominios A de receptores de LDL, anexina, dominio de trombospondina tipo 3 y dominios similares a EGF.

En la presente invención, cuando el ion metálico es un ion calcio, las condiciones de concentración de iones calcio incluyen condiciones de baja concentración de iones calcio y condiciones de alta concentración de iones calcio. "La actividad de unión varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones calcio" significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos varía debido a la diferencia en las condiciones entre las condiciones de concentración de iones calcio baja y alta. Por ejemplo, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos puede ser mayor en condiciones de alta concentración de iones calcio que en condiciones de baja concentración de iones calcio. Como alternativa, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos puede ser mayor en condiciones de baja concentración de iones calcio que en condiciones de alta concentración de iones calcio.

En este documento, la alta concentración de iones calcio no se limita en particular a un valor específico; sin embargo, la concentración puede seleccionarse preferiblemente entre 100 μM y 10 mM. En otra realización, la concentración puede seleccionarse entre 200 μM y 5 mM. En una realización alternativa, la concentración puede seleccionarse entre 400 μM y 3 mM. En otra realización más, la concentración puede seleccionarse entre 200 μM y 2 mM. Además, la concentración puede seleccionarse entre 400 μM y 1 mM. En particular, se prefiere una concentración seleccionada entre 500 μM y 2,5 mM, que está cerca de la concentración en plasma (sangre) de ion calcio *in vivo*.

En la presente, la baja concentración de iones calcio no se limita en particular a un valor específico; sin embargo, la concentración puede seleccionarse preferiblemente entre 0,1 μM y 30 μM . En otra realización, la concentración puede seleccionarse entre 0,2 μM y 20 μM . En otra realización más, la concentración puede seleccionarse entre 0,5 μM y 10 μM . En una realización alternativa, la concentración puede seleccionarse entre 1 μM y 5 μM . Además, la concentración puede seleccionarse entre 2 μM y 4 μM . En particular, se prefiere una concentración seleccionada entre 1 μM y 5 μM , que está cerca de la concentración de calcio ionizado en los endosomas tempranos *in vivo*.

Como se usa en este documento, "la actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio" significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos es más débil en una concentración de iones calcio seleccionada entre

0,1 μM y 30 μM que a una concentración de iones calcio seleccionada entre 100 μM y 10 mM. Preferiblemente, significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos es más débil a una concentración de ion calcio seleccionada entre 0,5 μM y 10 μM que a una concentración de ion calcio seleccionada entre 200 μM y 5 mM. De manera particularmente preferida, significa que la actividad de unión al antígeno a la concentración de iones calcio en los endosomas tempranos *in vivo* es más débil que a la concentración de iones calcio en plasma *in vivo*; y específicamente, significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos es más débil a una concentración de ion calcio seleccionada entre 1 μM y 5 μM que a una concentración de ion calcio seleccionada entre 500 μM y 2,5 mM.

Puede determinarse si la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos cambia dependiendo de las condiciones de concentración de iones metálicos, por ejemplo, mediante el uso de métodos de medición conocidos tales como los descritos en la sección "Actividad de unión" anterior. Por ejemplo, para confirmar que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos es mayor en condiciones de alta concentración de iones calcio que en condiciones de baja concentración de iones calcio, se compara la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión a antígenos en condiciones de concentración baja y alta de iones calcio.

Como se usa en el presente documento, la expresión "la actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio" también se puede expresar como "la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos es mayor en una condición de alta concentración de iones calcio que en una condición de baja concentración de iones calcio". Como se usa en este documento, "la actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio" a veces se escribe como "la capacidad de unión al antígeno es más débil en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio". Además, "la actividad de unión al antígeno en una condición de baja concentración de iones calcio se reduce para ser más baja que en una condición de alta concentración de iones calcio" puede escribirse como "la capacidad de unión al antígeno en una condición de baja concentración de iones calcio es más débil que en condiciones de alta concentración de iones calcio".

Cuando se determina la actividad de unión al antígeno, los expertos en la técnica pueden seleccionar adecuadamente otras condiciones distintas de la concentración de iones calcio, y no están en particular limitadas. Por ejemplo, la actividad se puede determinar a 37 °C en tampón HEPES. Por ejemplo, se puede usar Biacore (GE Healthcare) o similar para la determinación. Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos se puede evaluar haciendo fluir el antígeno como analito sobre un chip sobre el que se inmoviliza la molécula de unión a antígenos. Cuando el antígeno es un antígeno de membrana, la actividad de unión de una molécula de unión a antígenos al antígeno de membrana puede evaluarse haciendo fluir la molécula de unión a antígenos como un analito sobre un chip sobre el que se inmoviliza el antígeno.

Siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos sea más débil en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio, la proporción de la actividad de unión al antígeno entre las condiciones de baja y alta concentración de iones calcio es no en particular limitado. Sin embargo, la proporción de la KD (constante de disociación) de la molécula de unión a antígenos para un antígeno en una condición de baja concentración de iones calcio con respecto a la KD en una condición de alta concentración de iones calcio, es decir, el valor de la KD (Ca 3 μM)/KD (Ca 2 mM) es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 10 o más, y aún más preferiblemente 40 o más. El límite superior del valor de la KD (3 μM Ca)/KD (2 mM Ca) no está en particular limitado y puede ser cualquier valor, como 400, 1000 o 10000, siempre que la molécula se pueda producir mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, se puede usar la KD (constante de disociación) para representar la actividad de unión al antígeno. Por otra parte, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, se puede usar la KD aparente (constante de disociación aparente) para representar la actividad. La KD (constante de disociación) y la KD aparente (constante de disociación aparente) se pueden determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare), una gráfica de Scatchard o un citómetro de flujo.

Como alternativa, por ejemplo, la constante de velocidad de disociación (kd) también se puede usar preferiblemente como índice para representar la proporción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos descrita en el presente documento entre concentraciones calcio bajas y altas. Cuando se utiliza la constante de velocidad de disociación (kd) en lugar de la constante de disociación (KD) como índice para representar la proporción de actividad de unión, la proporción de la constante de velocidad de disociación (kd) entre condiciones de concentración de calcio baja y alta, es decir, el valor de kd (condición de baja concentración de calcio)/kd (condición de alta concentración de calcio) es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 5 o más, aún más preferiblemente 10 o más, y aún más preferiblemente 30 o más. El límite superior del valor de Kd (condición de baja concentración de calcio)/kd (condición de alta concentración de calcio) no está en particular limitado y puede ser cualquier valor, como 50, 100 o 200, siempre que la molécula se pueda producir mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, se puede usar la kd (constante de velocidad de disociación) para representar la actividad de unión al antígeno. Por otra parte, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, se puede usar la kd aparente (constante de velocidad de disociación aparente) para representar la actividad de unión

al antígeno. La k_d (constante de velocidad de disociación) y la k_d aparente (constante de velocidad de disociación aparente) se pueden determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare) o un citómetro de flujo. Cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos se determina a diferentes concentraciones de iones calcio, es preferible utilizar las mismas condiciones excepto para las concentraciones calcio.

5

Por ejemplo, se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio mediante la selección de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos), que incluye las siguientes etapas (a) a (c):

10 (a) determinar la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en una condición de baja concentración de calcio;

(b) determinar la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en una condición de alta concentración de calcio; y

15 (c) seleccionar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de calcio que en una condición de alta concentración de calcio.

Además, se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en condiciones de baja concentración de iones calcio que en condiciones de alta concentración de iones calcio mediante la selección de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) o de un banco de los mismos, que incluye las siguientes etapas (a) a (c):

20 (a) poner en contacto un antígeno con un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos), o un banco del mismo en una condición de alta concentración de calcio;

(b) incubar en condiciones de baja concentración de calcio un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que se ha unido al antígeno en la etapa (a); y

(c) aislar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) disociado en la etapa (b).

25 Además, se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio mediante la selección de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) o un banco de los mismos, que incluye las siguientes etapas (a) a (d):

30 (a) poner en contacto un antígeno con un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) en condiciones de baja concentración de calcio;

(b) seleccionar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que no se une al antígeno en la etapa (a);

(c) permitir que el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) seleccionado en la etapa (b) se una al antígeno en condiciones de alta concentración de calcio; y

35 (d) aislar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que se ha unido al antígeno en la etapa (c).

Además, puede obtenerse un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio mediante un método de selección que comprende las siguientes etapas (a) a (c):

40 (a) poner en contacto, en condiciones de alta concentración de calcio, un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) con una columna sobre la que se inmoviliza un antígeno;

(b) eluir un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que se ha unido a la columna en la etapa (a) de la columna en condiciones de baja concentración de calcio; y

(c) aislar el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) eluido en la etapa (b).

45 Además, puede obtenerse un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio mediante un método de selección que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

(a) permitir, en condiciones de baja concentración de calcio, que un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) pase a través de una columna sobre la que se inmoviliza un antígeno;

50 (b) recoger un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que ha eluido sin unirse a la columna en la etapa (a);

(c) permitir que el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) recogido en la etapa (b) se una al antígeno en condiciones de alta concentración de calcio; y

(d) aislar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que se ha unido al antígeno en la etapa (c).

5 Además, puede obtenerse un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio mediante un método de selección que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

(a) poner en contacto un antígeno con un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) en condiciones de alta concentración de calcio;

(b) obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que se ha unido al antígeno en la etapa (a);

10 (c) incubar en condiciones de baja concentración de calcio el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) obtenido en la etapa (b); y

(d) aislar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en la etapa (c) es más débil que el criterio para la selección de la etapa (b).

15 Las etapas descritas anteriormente se pueden repetir dos o más veces. Por tanto, la presente descripción proporciona dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en una condición de baja concentración de iones calcio que en una condición de alta concentración de iones calcio, que se obtienen mediante métodos de selección que además comprenden la etapa de repetir dos o más veces las etapas (a) a (c) o (a) a (d) en los métodos de selección descritos anteriormente. El número de ciclos de las etapas (a) a (c) o (a) a (d) no está en particular limitado, pero generalmente es 10 o menos.

20 En los métodos de selección descritos en este documento, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en una condición de baja concentración de calcio no está en particular limitada siempre que sea una actividad de unión al antígeno a una concentración de calcio ionizado de entre 0,1 μM y 30 μM , pero preferiblemente tiene una actividad de unión al antígeno a una concentración de calcio ionizado de entre 0,5 μM y 10 μM . Más preferiblemente, tiene una actividad de unión al antígeno a la concentración de calcio ionizado
25 en la célula *in vivo*, en particular a la concentración de calcio ionizado en los endosomas tempranos, específicamente, entre 1 μM y 5 μM . Por otra parte, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en condiciones de alta concentración de calcio no está en particular limitada, siempre que sea una actividad de unión al antígeno a una concentración de calcio ionizado de entre 100 μM y 10 mM, pero preferiblemente tiene una actividad de unión al antígeno a una concentración de calcio ionizado de entre 200 μM y 5 mM. Más
30 preferiblemente, tiene una actividad de unión al antígeno a la concentración de calcio ionizado en la célula *in vivo*, en particular a la concentración de calcio ionizado en plasma, específicamente, entre 0,5 mM y 2,5 mM.

La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) puede medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden determinar otras condiciones distintas de la concentración de calcio ionizado. La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión
35 al antígeno (o molécula de unión a antígenos) se puede evaluar como una constante de disociación (KD), una constante de disociación aparente (KD aparente), una constante de velocidad de disociación (kd), una constante de disociación aparente (kd aparente) y similares. Estas se pueden determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare), una gráfica de Scatchard o FACS.

40 Como se describe en este documento, la etapa de seleccionar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es mayor en una condición de alta concentración de calcio que en una condición de baja concentración de calcio es sinónima de la etapa de seleccionar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno es menor en condiciones de baja concentración de calcio que en condiciones de alta concentración de calcio.

45 Siempre que la actividad de unión al antígeno sea mayor en condiciones de alta concentración de calcio que en condiciones de baja concentración de calcio, la diferencia en la actividad de unión al antígeno entre condiciones de alta y baja concentración de calcio no está en particular limitada; sin embargo, la actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de calcio es preferiblemente dos o más veces mayor, más preferiblemente 10 o más veces mayor, y todavía más preferiblemente 40 o más veces mayor que en condiciones de baja concentración de calcio.

50 Los dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) descritos en el presente documento para ser seleccionados mediante los métodos de selección descritos anteriormente pueden ser cualquier dominio de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos). Por ejemplo, es posible seleccionar los dominios de unión al antígeno descritos anteriormente (o moléculas de unión a antígenos). Por ejemplo, pueden seleccionarse dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) que tienen secuencias naturales o secuencias de aminoácidos sustituidas.

Bancos (banco)

En una realización, se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) como se describe en la presente a partir de un banco que se compone principalmente de una pluralidad de moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios de unión al antígeno tienen al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Las concentraciones de iones incluyen preferiblemente, por ejemplo, concentración de iones metálicos y concentración de protones.

En este documento, un "banco" se refiere a una pluralidad de moléculas de unión a antígenos o una pluralidad de polipéptidos de fusión que contienen moléculas de unión a antígenos, o ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican sus secuencias. Las secuencias de una pluralidad de moléculas de unión a antígenos o de una pluralidad de polipéptidos de fusión que contienen moléculas de unión a antígenos en un banco no son idénticas, sino que son diferentes entre sí.

En la presente, la expresión "las secuencias son diferentes entre sí" en la expresión "una pluralidad de moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí" significa que las secuencias de moléculas de unión a antígenos en un banco son diferentes entre sí. Específicamente, en un banco, el número de secuencias diferentes entre sí refleja el número de clones independientes con secuencias diferentes y también puede denominarse "tamaño del banco". El tamaño del banco de un banco de presentación de fagos convencional varía de 10^6 a 10^{12} . El tamaño del banco se puede aumentar hasta 10^{14} mediante el uso de técnicas conocidas, como la presentación de ribosomas. Sin embargo, el número real de partículas de fagos utilizadas en la selección de inmunoadsorción de un banco de fagos es en general 10-10000 veces mayor que el tamaño del banco. Este exceso de multiplicidad también se denomina "el número de equivalentes del banco" y significa que hay de 10 a 10000 clones individuales que tienen la misma secuencia de aminoácidos. Por tanto, la frase "las secuencias son diferentes entre sí" significa que las secuencias de moléculas de unión a antígenos independientes en un banco, excluyendo los equivalentes del banco, son diferentes entre sí. Más específicamente, lo anterior significa que hay 10^6 a 10^{14} moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí, preferiblemente 10^7 a 10^{12} moléculas, más preferiblemente 10^8 a 10^{11} moléculas, y con especial preferencia 10^8 a 10^{10} moléculas cuyas secuencias son diferentes entre sí.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una pluralidad de" en la expresión "un banco compuesto principalmente por una pluralidad de moléculas de unión a antígenos" generalmente se refiere, en el caso, por ejemplo, de moléculas de unión a antígenos, polipéptidos de fusión, moléculas de polinucleótidos, vectores o virus como se describe en este documento, un grupo de dos o más tipos de la sustancia. Por ejemplo, cuando dos o más sustancias son diferentes entre sí en una característica particular, esto significa que hay dos o más tipos de la sustancia. Dichos ejemplos pueden incluir, por ejemplo, aminoácidos mutantes observados en posiciones específicas de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, cuando hay dos o más moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son sustancialmente iguales o preferiblemente iguales excepto por restos flexibles o excepto por aminoácidos mutantes particulares en posiciones hipervariables expuestas en la superficie, hay una pluralidad de moléculas de unión a antígenos de la presente descripción. En otro ejemplo, cuando existen dos o más moléculas de polinucleótidos cuyas secuencias son sustancialmente iguales o preferiblemente iguales excepto por nucleótidos que codifican restos flexibles o nucleótidos que codifican aminoácidos mutantes de posiciones hipervariables expuestas en la superficie, hay una pluralidad de moléculas de polinucleótidos de la presente descripción.

Además, la expresión "compuesto principalmente por" en la expresión "un banco compuesto principalmente por una pluralidad de moléculas de unión a antígenos" refleja el número de moléculas de unión a antígenos cuya actividad de unión al antígeno varía según las condiciones de concentración de iones, entre clones independientes con diferentes secuencias en un banco. Específicamente, es preferible que haya al menos 10^4 moléculas de unión a antígenos que tienen dicha actividad de unión en un banco. Más preferiblemente, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco que contiene al menos 10^5 moléculas de unión a antígenos que tienen dicha actividad de unión. Aún más preferiblemente, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco que contiene al menos 10^6 moléculas de unión a antígenos que tienen dicha actividad de unión. En particular preferiblemente, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco que contiene al menos 10^7 moléculas de unión a antígenos que tienen dicha actividad de unión. Aún más preferiblemente, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco que contiene al menos 10^8 moléculas de unión a antígenos que tienen dicha actividad de unión. Como alternativa, esto también puede expresarse preferiblemente como la proporción del número de moléculas de unión a antígenos cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones con respecto al número de clones independientes que tienen diferentes secuencias en un banco. Específicamente, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco, en el que las moléculas de unión a antígenos que tienen dicha actividad de unión representan del 0,1 % al 80 %, preferiblemente del 0,5 % al 60 %, más preferiblemente del 1 % al 40 %, aún más, preferiblemente del 2 % al 20 %, y en particular preferiblemente del 4 % al 10 % de clones independientes con diferentes secuencias en el banco. En el caso de polipéptidos de fusión, moléculas de polinucleótidos o vectores, pueden ser posibles expresiones similares usando el número de moléculas o la proporción con el número total de moléculas. En el caso de los virus, también pueden ser posibles expresiones similares utilizando el número de viriones o la proporción con el número total de viriones.

Aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de los dominios de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones calcio

Los dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) que se van a seleccionar mediante los métodos de selección descritos anteriormente pueden prepararse de cualquier manera. Por ejemplo, cuando el ion metálico es ion calcio, es posible utilizar anticuerpos preexistentes, bancos preexistentes (banco de fagos, etc.), anticuerpos o bancos preparados a partir de hibridomas obtenidos inmunizando animales o a partir de células B de animales inmunizados, anticuerpos o bancos obtenidos mediante la introducción de aminoácidos capaces de quelar el calcio (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico) o mutaciones de aminoácidos no naturales en los anticuerpos o bancos descritos anteriormente (aminoácidos que pueden quelarse con el calcio (tales como ácido aspártico y ácido glutámico), bancos con mayor contenido en aminoácidos no naturales, bancos preparados mediante la introducción de aminoácidos que pueden quelarse con el calcio (tales como ácido aspártico y ácido glutámico) o mutaciones de aminoácidos no naturales en posiciones particulares, o similares.

Los ejemplos de los aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones, como se describe anteriormente, pueden ser cualquier tipo de aminoácidos siempre que los aminoácidos formen un motivo de unión al calcio. Los motivos de unión al calcio son bien conocidos por los expertos en la técnica y se han descrito en detalle (por ejemplo, Springer *et al.* (Cell (2000), 102, 275-277); Kawasaki y Kretsinger (Protein Prof. (1995), 2, 305-490); Moncrief *et al.* (J. Mol. Evol. (1990), 30, 522-562); Chauvaux *et al.* (Biochem. J. (1990), 265, 261-265.); Bairoch y Cox (FEBS Lett. (1990), 269, 454-456); Davis (New Biol. (1990), 2, 410-419); Schaefer *et al.* (Genomics (1995), 25, 638-643); Economou *et al.* (EMBO J. (1990), 9, 349-354); Wurzburg *et al.* (Structure (2006), 14, 6, 1049-1058)). Específicamente, cualquier motivo de unión al calcio conocido, incluidas las lectinas de tipo C, tales como ASGPR, CD23, MBR y DC-SIGN, puede incluirse en las moléculas de unión a antígenos de la presente descripción. Los ejemplos preferidos de tales motivos de unión al calcio preferidos también incluyen, además de los descritos anteriormente, por ejemplo, el motivo de unión al calcio en el dominio de unión al antígeno de SEQ ID NO:2.

Además, como aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración del ion calcio, por ejemplo, también se pueden usar preferiblemente aminoácidos que tienen actividad quelante de metales. Los ejemplos de tales aminoácidos quelantes de metales incluyen, por ejemplo, serina (Ser (S)), treonina (Thr (T)), asparagina (Asn (N)), glutamina (Gln (Q)), ácido aspártico (Asp (D)) y ácido glutámico (Glu (E)).

Las posiciones en los dominios de unión al antígeno en las que están contenidos los aminoácidos descritos anteriormente no están en particular limitadas a posiciones particulares, y pueden ser cualquier posición dentro de la región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera que forma un dominio de unión al antígeno, siempre que alteren la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones calcio. Más específicamente, los dominios de unión al antígeno como se describen en este documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios de unión al antígeno de cadena pesada contienen aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones calcio. En otra realización, los dominios de unión al antígeno descritos en el presente documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de cadena pesada contienen los aminoácidos mencionados anteriormente. En otra realización más, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de cadena pesada contienen los aminoácidos mencionados anteriormente en las posiciones 95, 96, 100a y/o 101 como se indica de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Por otra parte, los dominios de unión al antígeno como se describen en este documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios de unión al antígeno de cadena ligera contienen aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones calcio. En otra realización, los dominios de unión al antígeno descritos en el presente documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR1 de cadena ligera contienen los aminoácidos mencionados anteriormente. En otra realización más, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR1 de cadena ligera contienen los aminoácidos mencionados anteriormente en las posiciones 30, 31 y/o 32 como se indica según el sistema de numeración de Kabat.

En otra realización, los dominios de unión al antígeno como se describen en este documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR2 de cadena ligera contienen los restos aminoácidos mencionados anteriormente. En otra realización más, en el presente documento se describen bancos compuestos principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR2 de cadena ligera contienen los restos

aminoácidos mencionados anteriormente en la posición 50 como se indica según el sistema de numeración de Kabat.

En otra realización más, los dominios de unión al antígeno como se describen en este documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de cadena ligera contienen los restos aminoácidos mencionados anteriormente. En una realización alternativa, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de cadena ligera contienen los restos aminoácidos mencionados anteriormente en la posición 92 como indicado según el sistema de numeración de Kabat.

Además, en una realización diferente, los dominios de unión al antígeno como se describen en el presente documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y en las que dos o tres CDR seleccionadas de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera descritas anteriormente contienen los restos aminoácidos mencionados anteriormente. Además, los dominios de unión al antígeno como se describen en este documento se pueden obtener de un banco compuesto principalmente por moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyas cadenas ligeras contienen los restos aminoácidos mencionados anteriormente en una o más de las posiciones 30, 31, 32, 50 y/o 92 como se indica según el sistema de numeración de Kabat.

En una realización particularmente preferida, las secuencias de marco de la región variable de cadena ligera y/o cadena pesada de una molécula de unión a antígenos contienen preferiblemente secuencias de marco de la línea germinal humana. Por tanto, cuando las secuencias de marco son secuencias completamente humanas, se espera que cuando se administre a seres humanos una molécula de unión a antígenos como la descrita en el presente documento (por ejemplo, para tratar enfermedades), esta induzca poca o ninguna respuesta inmunogénica. En el sentido anterior, la expresión "que contiene una secuencia de línea germinal" como se usa en este documento significa que una parte de las secuencias de marco es idéntica a una parte de cualquier secuencia de marco de la línea germinal humana. Por ejemplo, cuando la secuencia de FR2 de cadena pesada de una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento es una combinación de secuencias de FR2 de cadena pesada de diferentes secuencias de marco de la línea germinal humana, dicha molécula también es una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento "que contiene una secuencia de la línea germinal".

Los ejemplos preferidos de los marcos incluyen, por ejemplo, secuencias de la región de marco completamente humanas conocidas actualmente, que se incluyen en el sitio web de V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) u otros. Estas secuencias de la región de marco se pueden usar de manera apropiada como una secuencia de línea germinal contenida en una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento. Las secuencias de la línea germinal pueden clasificarse según su similitud (Tomlinson *et al.* (J. Mol. Biol. (1992), 227, 776-798); Williams y Winter (Eur. J. Immunol. (1993), 23, 1456-1461); Cox *et al.* (Nat. Genetics (1994), 7, 162-168)). Las secuencias de la línea germinal apropiadas pueden seleccionarse de Vk, que se agrupa en siete subgrupos; Vλ, que se agrupa en diez subgrupos; y VH, que se agrupa en siete subgrupos.

Las secuencias de VH completamente humanas incluyen preferiblemente, pero no se limitan, por ejemplo, a secuencias de VH de:

subgrupo VH1 (por ejemplo, VH1-2, VH1-3, VH1-8, VH1-18, VH1-24, VH1-45, VH1-46, VH1-58 y VH1-69);

subgrupo VH2 (por ejemplo, VH2-5, VH2-26 y VH2-70);

subgrupo VH3 (VH3-7, VH3-9, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-72, VH3-73 y VH3-74);

subgrupo VH4 (VH4-4, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-59 y VH4-61);

subgrupo VH5 (VH5-51);

subgrupo VH6 (VH6-1); y

subgrupo VH7 (VH7-4 y VH7-81).

Estas también se describen en documentos conocidos (Matsuda *et al.* (J. Exp. Med. (1998), 188, 1973-1975)) y similares, y así los expertos en la técnica pueden diseñar de modo apropiado moléculas de unión a antígenos de la presente descripción basándose en la información de estas secuencias. También es preferible utilizar otros marcos o subregiones de marcos completamente humanos.

Las secuencias de Vk completamente humanas incluyen preferiblemente, pero no se limitan, por ejemplo, a:

A20, A30, L1, L4, L5, L8, L9, L11, L12, L14, L15, L18, L19, L22, L23, L24, O2, O4, O8, O12, O14 y O18 agrupadas en el subgrupo Vk1;

A1, A2, A3, A5, A7, A17, A18, A19, A23, O1 y O11, agrupadas en el subgrupo Vk2;

A11, A27, L2, L6, L10, L16, L20 y L25, agrupadas en el subgrupo Vk3;

B3, agrupada en el subgrupo Vk4;

B2 (en el presente documento también denominado Vk5-2), agrupada en el subgrupo Vk5; y

A10, A14 y A26, agrupadas en el subgrupo Vk6

- 5 (Kawasaki *et al.* (Eur. J. Immunol. (2001), 31, 1017-1028); Schable y Zachau (Biol. Chem. Hoppe Seyler (1993), 374, 1001-1022); Brensing-Kuppers *et al.* (Gene (1997), 191, 173-181)).

Las secuencias de Vλ completamente humanas incluyen preferiblemente, pero no se limitan, por ejemplo, a:

V1-2, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1- 20 y V1-22, agrupadas en el subgrupo VL1;

- 10 V2-1, V2-6, V2-7, V2-8, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17 y V2-19, agrupadas en el subgrupo VL1;

V3-2, V3-3 y V3-4, agrupadas en el subgrupo VL3;

V4-1, V4-2, V4-3, V4-4 y V4-6, agrupadas en el subgrupo VL4; y

V5-1, V5-2, V5-4 y V5-6, agrupadas en el subgrupo VL5

(Kawasaki *et al.* (Genoma Res. (1997), 7, 250-261)).

- 15 Normalmente, estas secuencias de marco son diferentes entre sí en uno o más restos aminoácidos. Estas secuencias de marco se pueden usar en combinación con "al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones" como se describe en el presente documento. Otros ejemplos de marcos completamente humanos usados en combinación con "al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las
- 20 condiciones de concentración de iones" incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (por ejemplo, Kabat *et al.* (1991), *supra*; Wu *et al.* (J. Exp. Med. (1970), 132, 211-250)).

- Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que una de las razones de la expectativa de que el uso de secuencias de la línea germinal evite las respuestas inmunes adversas en la mayoría de los individuos es la siguiente. Como resultado del proceso de maduración por afinidad durante las respuestas inmunitarias normales, se
- 25 producen con frecuencia mutaciones somáticas en las regiones variables de la inmunoglobulina. Dichas mutaciones aparecen principalmente alrededor de las CDR cuyas secuencias son hipervariables, pero también afectan a los restos de las regiones marco. Tales mutaciones de marco no existen en los genes de la línea germinal y también es menos probable que sean inmunogénicas en los pacientes. Por otro lado, la población humana normal está expuesta a la mayoría de las secuencias de marco expresadas a partir de los genes de la línea germinal. Como resultado de la
- 30 inmunotolerancia, se espera que estos marcos de la línea germinal tengan una inmunogenicidad baja o nula en los pacientes. Para maximizar la posibilidad de inmunotolerancia, los genes que codifican la región variable pueden seleccionarse de un grupo de genes de la línea germinal funcionales que se aparecen comúnmente.

- Pueden emplearse de modo apropiado métodos conocidos, como la mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82, 488-492)) y la PCR de extensión por solapamiento, para producir las moléculas de unión a antígenos como se describe en este documento, en las que las secuencias de marco descritas anteriormente
- 35 contienen aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones calcio.

- Por ejemplo, se puede construir un banco que contiene una pluralidad de moléculas de unión a antígenos de la presente descripción cuyas secuencias son diferentes entre sí combinando regiones variables de cadena pesada
- 40 preparadas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas con una región variable de cadena ligera seleccionada como una secuencia de marco que contiene originalmente al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración del ion calcio. Como ejemplo no limitante, cuando la concentración de iones es la concentración de iones calcio, tales bancos preferidos incluyen, por ejemplo, los bancos contruidos combinando la secuencia de la
- 45 región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:2 (Vk5-2) y la región variable de cadena pesada producida como un banco de secuencias de región variable aleatorias.

- Como alternativa, una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada como región de marco que contiene originalmente al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones como se mencionó anteriormente, puede
- 50 diseñarse para contener varios restos aminoácidos distintos de los restos aminoácidos anteriores. Como se usa en el presente documento, dichos restos se denominan restos flexibles. El número y la posición de los restos flexibles no están en particular limitados siempre que la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión a antígenos varíe dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o secuencias

de FR de la cadena pesada y/o cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles. Por ejemplo, cuando la concentración de iones es la concentración de iones calcio, los ejemplos no limitantes de restos flexibles que se van a introducir en la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:2 (Vk5-2) incluyen los restos aminoácidos enumerados en la tabla 1 o 2.

5 Tabla 1

CDR	Posición	70 % del total				
CDR1	28	S; 100 %				
	29	I ; 100 %				
	30	E; 72 %	H; 14 %	S; 14 %		
	31	D; 100 %				
	32	D; 100 %				
	33	L; 100 %				
	34	A; 70 %	N; 30 %			
CDR2	50	E; 100 %				
	51	A ; 100 %				
	52	S; 100 %				
	53	H; 5 %	N; 25 %	S; 45 %	T; 25 %	
	54	L; 100 %				
	55	Q; 100 %				
	56	S; 100 %				
CDR3	90	Q; 100 %				
	91	H; 25 %	S; 15 %	R; 15 %	Y; 45 %	
	92	D; 80 %	N; 10 %	S; 10 %		
	93	D; 5 %	G; 10 %	NORTE; 25 %	S; 50 %	R; 10 %
	94	S; 50 %	Y; 50 %			
	95	P; 100 %				
	96	L; 50 %	Y; 50 %			
(La posición indica la numeración de Kabat) Cuando la posición 92, como indica la numeración de Kabat, es Asn (N), la posición 94 puede ser Leu (L) en lugar de Ser (S).						

Tabla 2

CDR	Numeración de Kabat	30 % aminoácidos del total				
CDR1	28	S: 100 %				
	29	I: 100 %				
	30	E: 83 %	S: 17 %			
	31	D: 100 %				
	32	D: 100 %				
	33	L: 100 %				
	34	R: 70 %	N: 30 %			
CDR2	50	H: 100 %				
	51	A: 100 %				
	52	S: 100 %				

CDR	Numeración de Kabat	30 % aminoácidos del total				
	53	H: 5 %	N: 25 %	S: 45 %	T: 25 %	
	54	L: 100 %				
	55	Q: 100 %				
	56	S: 100 %				
CDR3	90	Q: 100 %				
	91	H: 25 %	S: 15 %	R: 15 %	Y: 45 %	
	92	D: 80 %	N: 10 %	S: 10 %		
	93	D: 5 %	G: 10 %	N: 25 %	S: 50 %	R: 10 %
	94	S: 50 %	Y: 50 %			
	95	P: 100 %				
	96	L: 50 %	Y: 50 %			

(La posición indica la numeración de Kabat)
 Cuando la posición 92, como indica la numeración de Kabat, es Asn (N), la posición 94 puede ser Leu (L) en lugar de Ser (S).

En el presente documento, los restos flexibles se refieren a variaciones de restos aminoácidos presentes en posiciones hipervariables en las que están presentes varios aminoácidos diferentes en las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o dominios de unión al antígeno conocidos y/o nativos. Las posiciones hipervariables se encuentran generalmente en las regiones CDR. En una realización, los datos proporcionados por Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Instituto Nacional de Salud Bethesda Md.) (1987 y 1991) son útiles para determinar posiciones hipervariables en anticuerpos conocidos y/o nativos. Además, las bases de datos en Internet (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>, <http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>) proporcionan las secuencias recopiladas de muchas cadenas ligeras y cadenas pesadas humanas y sus ubicaciones. La información sobre las secuencias y ubicaciones es útil para determinar posiciones hipervariables. De acuerdo con la presente descripción, cuando una determinada posición de aminoácido tiene preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 posibles variaciones de restos aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 19, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 18, preferiblemente de 5 a 17, preferiblemente de 6 a 16, preferiblemente de 7 a 15, preferiblemente de 8 a 14, preferiblemente de 9 a 13 y preferiblemente de 10 a 12 posibles variaciones de restos aminoácidos, la posición es hipervariable. En algunas realizaciones, una determinada posición de aminoácido puede tener preferiblemente al menos aproximadamente 2, preferiblemente al menos aproximadamente 4, preferiblemente al menos aproximadamente 6, preferiblemente al menos aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 10, y preferiblemente aproximadamente 12 variaciones de restos aminoácidos.

Como alternativa, se puede construir un banco que contenga una pluralidad de moléculas de unión a antígenos como se describe en este documento, cuyas secuencias son diferentes entre sí, combinando regiones variables de cadena pesada producidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas con regiones variables de cadena ligera en las que se introduce al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de moléculas de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones, como se mencionó anteriormente. Cuando la concentración de iones es la concentración de iones calcio, los ejemplos no limitantes de tales bancos incluyen preferiblemente, por ejemplo, bancos en los que las regiones variables de cadena pesada producidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas se combinan con secuencias de regiones variables de cadena ligera en las que uno o más restos concretos en una secuencia de línea germinal, como SEQ ID NO:3 (Vk1), SEQ ID NO:4 (Vk2), SEQ ID NO:5 (Vk3), o SEQ ID NO:6 (Vk4), se ha sustituido por al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración del ion calcio. Los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos incluyen restos aminoácidos en la CDR1 de cadena ligera. Además, los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos incluyen restos aminoácidos en la CDR2 de cadena ligera. Además, los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos también incluyen restos aminoácidos en la CDR3 de cadena ligera.

Los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos contenidos en la CDR1 de cadena ligera incluyen los que se encuentran en las posiciones 30, 31 y/o 32 en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera como se indica mediante la numeración EU. Además, los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos contenidos en la CDR2 de cadena ligera incluyen un resto aminoácido en la posición 50 en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera como se indica mediante la numeración de Kabat. Además, los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos contenidos en la CDR3 de cadena ligera incluyen un resto aminoácido en la posición 92 en la CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se indica mediante la numeración de Kabat. Estos restos aminoácidos pueden estar contenidos por sí solos

o en combinación siempre que formen un motivo de unión al calcio y/o siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos varíe dependiendo de las condiciones de concentración del ion calcio. Por otra parte, puesto que la troponina C, la calmodulina, la parvalbúmina y la cadena ligera de miosina, que tienen varios sitios de unión de iones calcio y que se cree que se derivan de un origen común en términos de evolución molecular, se conocen, las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y/o CDR3 pueden diseñarse para que contengan sus motivos de unión. Por ejemplo, es posible usar dominios de cadherina, mano EF de calmodulina, dominio C2 de la proteína quinasa C, dominio Gla de la proteína de coagulación sanguínea factor IX, lectinas de tipo C del receptor de asialoglicoproteína y receptor de unión a manosa, dominios A de los receptores de LDL, anexina, dominio de trombospodina de tipo 3 y dominios similares a EGF de una manera apropiada para los propósitos anteriores.

Cuando las regiones variables de cadena pesada producidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas y las regiones variables de cadena ligera en las que se ha introducido al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones se combinan como descrito anteriormente, las secuencias de las regiones variables de cadena ligera pueden diseñarse para contener restos flexibles de la misma manera que se describe anteriormente. El número y la posición de tales restos flexibles no se limitan en particular a realizaciones particulares siempre que la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión a antígenos como se describe en el presente documento varíe dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o secuencias de FR de cadena pesada y/o cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles. Cuando la concentración de iones es la concentración de iones calcio, los ejemplos no limitantes de restos flexibles a introducir en la secuencia de la región variable de la cadena ligera incluyen los restos aminoácidos enumerados en las tablas 1 y 2.

Las regiones variables de cadena pesada preferidas para combinar incluyen, por ejemplo, bancos de regiones variables aleatorizadas. Los métodos conocidos se combinan según sea apropiado para producir un banco de regiones variables aleatorizadas. En una realización no limitante, se puede utilizar preferiblemente un banco inmunológico construido a partir de genes de anticuerpos derivados de linfocitos de animales inmunizados con un antígeno específico, pacientes con infecciones, personas con una titulación de anticuerpos elevada en sangre como resultado de la vacunación, pacientes con cáncer o pacientes con enfermedades autoinmunes como un banco de regiones variables aleatorizadas.

En otra realización no limitante, también se puede usar preferiblemente un banco sintético producido reemplazando las secuencias de CDR de los genes V en el ADN genómico o los genes V remodelados funcionales con un conjunto de oligonucleótidos sintéticos que contienen secuencias que codifican conjuntos de codones de una longitud apropiada como un banco de regiones variables aleatorizadas. En este caso, dado que se observa diversidad de secuencia en la secuencia de CDR3 de cadena pesada, también es posible reemplazar solo la secuencia de CDR3. Un criterio para que surja diversidad en los aminoácidos de la región variable de una molécula de unión a antígenos es dar diversidad a los restos aminoácidos en las posiciones expuestas en la superficie de la molécula de unión a antígenos. La posición expuesta en la superficie se refiere a una posición que se considera que puede exponerse en la superficie y/o ponerse en contacto con un antígeno, según la estructura, el conjunto de estructuras y/o la estructura modelada de una molécula de unión a antígenos. En general, estas posiciones son CDR. Preferiblemente, las posiciones expuestas en la superficie se determinan usando las coordenadas de un modelo tridimensional de una molécula de unión a antígenos usando un programa informático como el programa InsightII (Accelrys). Las posiciones expuestas en la superficie se pueden determinar utilizando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (J. Mol. Biol. (1971), 55, 379-400); Connolly (J. Appl. Cryst. (1983), 16, 548-558)). La determinación de las posiciones expuestas en la superficie se puede realizar usando un software adecuado para la formación de modelos de proteínas y la información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. El software que se puede utilizar para estos fines incluye preferiblemente el software SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). General o preferiblemente, cuando un algoritmo requiere un parámetro de tamaño de entrada del usuario, el "tamaño" de una sonda que se usa en el cálculo se establece en aproximadamente 1,4 Angstrom o menos de radio. Además, los métodos para determinar las regiones y áreas expuestas en la superficie utilizando software para ordenadores personales se describen en Pacios (Comput. Chem. (1994), 18 (4), 377-386; J. Mol. Model. (1995), 1, 46-53).

En otra realización no limitante, un banco sin exposición, que se construye a partir de genes de anticuerpos derivados de linfocitos de personas sanas y cuyo repertorio consta de secuencias sin exposición, que son secuencias de anticuerpos sin sesgo, también se puede usar de manera en particular preferible como un banco de regiones variables aleatorizadas (Gejima *et al.* (Human antibodies (2002), 11, 121-129); Cardoso *et al.* (Scand. J. Immunol. (2000), 51, 337-344)). En el presente documento, una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia sin exposición se refiere a una secuencia de aminoácidos obtenida de dicha biblioteca sin exposición.

En una realización, un dominio de unión al antígeno como se describe en este documento se puede obtener de un banco que contiene una pluralidad de moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí, preparadas combinando regiones variables de cadena ligera construidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas con una región variable de cadena pesada seleccionada como secuencia de marco que originalmente contiene "al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones". Cuando la concentración de iones es la concentración de iones calcio, los ejemplos no limitantes de tales bancos incluyen preferiblemente aquellos construidos combinando regiones variables de cadena ligera construidas como un banco de secuencias de regiones

variables aleatorizadas con la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:7 (6RL n.º 9-IgG1) o SEQ ID NO:8 (6KC4-1 n.º 85-IgG1). Como alternativa, dicho banco puede construirse seleccionando regiones variables de cadena ligera apropiadas de las que contienen secuencias de línea germinal, en lugar de regiones variables de cadena ligera construidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas. Tales bancos preferidos incluyen, por ejemplo, aquellos en los que la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:7 (6RL n.º 9-IgG1) o SEQ ID NO:8 (6KC4-1 n.º 85-IgG1) se combina con regiones variables de cadena ligera que contienen secuencias de línea germinal.

Como alternativa, se puede diseñar la secuencia de una región variable de cadena pesada seleccionada como una secuencia de marco que originalmente contiene "al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones", como se mencionó anteriormente, para que contenga restos flexibles. El número y la posición de los restos flexibles no están en particular limitados siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento varíe dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o de FR de cadena pesada y/o cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles. Cuando la concentración de iones es la concentración de iones calcio, los ejemplos no limitantes de restos flexibles que se introducirán en la secuencia de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:7 (6RL n.º 9-IgG1) incluyen todos los restos aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 de cadena pesada y los restos aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada excepto los que se encuentran en las posiciones 95, 96 y/o 100a. Como alternativa, los ejemplos no limitantes de restos flexibles que se introducirán en la secuencia de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:8 (6KC4-1 n.º 85-IgG1) incluyen todos los restos aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 de cadena pesada y los restos aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada excepto los que se encuentran en las posiciones de aminoácidos 95 y/o 101.

Como alternativa, se puede construir un banco que contiene una pluralidad de moléculas de unión a antígenos cuyas secuencias son diferentes entre sí combinando regiones variables de cadena ligera construidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas o regiones variables de cadena ligera que tienen secuencias de línea germinal con regiones variables de cadena pesada, en las que se ha introducido "al menos un resto aminoácido responsable del cambio dependiente de la concentración de iones en la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos" como se mencionó anteriormente. Cuando la concentración de iones es la concentración de iones calcio, los ejemplos no limitantes de tales bancos incluyen preferiblemente aquellos en los que las regiones variables de cadena ligera construidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas o regiones variables de cadena ligera que tienen secuencias de la línea germinal se combinan con la secuencia de una región variable de cadena pesada en la que uno o más restos concretos han sido sustituidos por al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración del ion calcio. Los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos incluyen restos aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada. Otros ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos incluyen restos aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada. Además, los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos también incluyen restos aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada. Los ejemplos no limitantes de tales restos aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada incluyen los aminoácidos de las posiciones 95, 96, 100a y/o 101 en la CDR3 de la región variable de la cadena pesada, como se indica mediante la numeración de Kabat. Además, estos restos aminoácidos pueden estar contenidos por sí solos o en combinación siempre que formen un motivo de unión al calcio y/o la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos varíe dependiendo de las condiciones de concentración del ion calcio.

Cuando las regiones variables de cadena ligera construidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas o regiones variables de la cadena ligera que tienen una secuencia de la línea germinal se combinan con una región variable de la cadena pesada en la que se ha introducido al menos un resto aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos que depende de las condiciones de concentración de iones como se mencionó anteriormente, la secuencia de la región variable de cadena pesada también se puede diseñar para que contenga restos flexibles de la misma manera que se describe anteriormente. El número y la posición de los restos flexibles no están en particular limitados siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento varíe dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o de FR de cadena pesada pueden contener uno o más restos flexibles. Además, los bancos de regiones variables aleatorizadas se pueden usar preferiblemente como secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la región variable de la cadena pesada distintas de los restos aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de condición de concentración de iones. Cuando las secuencias de la línea germinal se utilizan como regiones variables de cadena ligera, los ejemplos no limitantes de tales secuencias incluyen las de SEQ ID NO:3 (Vk1), SEQ ID NO:4 (Vk2), SEQ ID NO:5 (Vk3), y SEQ ID NO:6 (Vk4).

Cualquiera de los aminoácidos descritos anteriormente que alteran la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de las condiciones de concentración de iones calcio se pueden usar preferiblemente, siempre que formen un motivo de unión al calcio. Específicamente, tales aminoácidos incluyen aminoácidos donantes de electrones. Los ejemplos preferidos de tales aminoácidos donantes de electrones incluyen serina, treonina, asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y ácido glutámico.

Condición de las concentraciones de protones

En una realización, la condición de las concentraciones de iones se refiere a la condición de las concentraciones de protones o la condición del pH. Como se usa en este documento, la condición de concentración de protones, es decir, el núcleo del átomo de hidrógeno, se trata como sinónimo de condición de índice de hidrógeno (pH). Cuando la actividad de protones en una disolución acuosa se representa como aH^+ , el pH se define como $-\log_{10}aH^+$. Cuando la fuerza iónica de la disolución acuosa es baja (por ejemplo, inferior a 10^{-3}), aH^+ es casi igual a la fuerza de protones. Por ejemplo, el producto iónico del agua a 25 °C y 1 atmósfera es $K_w = aH^+ + aOH^- = 10^{-14}$, y por lo tanto en agua pura, $aH^+ = aOH^- = 10^{-7}$. En este caso, pH = 7 es neutro; una disolución acuosa cuyo pH es inferior a 7 es ácida, o cuyo pH es superior a 7 es alcalina.

Cuando se usa la condición de pH como condición de concentración de iones, las condiciones de pH incluyen condiciones de altas concentraciones de protones o pH bajos, es decir, una condición de intervalo de pH ácido, y condiciones de bajas concentraciones de protones o pH altos, es decir, una condición de intervalo de pH neutro. "La actividad de unión varía según la condición de pH" significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos varía debido a la diferencia en las condiciones de una alta concentración de protones o un pH bajo (un intervalo de pH ácido) y una baja concentración de protones o pH alto (un intervalo de pH neutro). Esto incluye, por ejemplo, el caso en el que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos es mayor en una condición de intervalo de pH neutro que en una condición de intervalo de pH ácido y el caso en el que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos es mayor en una condición de intervalo de pH ácido que en una condición de intervalo de pH neutro.

En la presente, el intervalo de pH neutro no se limita a un valor específico y se selecciona preferiblemente entre pH 6,7 y pH 10,0. En otra realización, el pH se puede seleccionar entre pH 6,7 y pH 9,5. En otra realización más, el pH se puede seleccionar entre pH 7,0 y pH 9,0. En otra realización más, el pH se puede seleccionar entre pH 7,0 y pH 8,0. En particular, el pH preferido incluye el pH extracelular *in vivo*, especialmente pH 7,4, que está cerca del pH del plasma (sangre).

En la presente, un intervalo de pH ácido no se limita a un valor específico y se selecciona preferiblemente entre pH 4,0 y pH 6,5. En otra realización, el pH se puede seleccionar entre pH 4,5 y pH 6,5. En otra realización más, el pH puede seleccionarse entre pH 5,0 y pH 6,5. En otra realización más, el pH se puede seleccionar entre pH 5,5 y pH 6,5. En particular, el pH preferido incluye el pH extracelular *in vivo*, especialmente pH 5,8, que está cerca del pH en los endosomas tempranos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, "la actividad de unión al antígeno de una molécula que se une a antígenos en una condición de alta concentración de protones o pH bajo (un intervalo de pH ácido) es menor que en una condición de baja concentración de protones o pH alto (un intervalo de pH neutro)" significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos a un pH seleccionado entre pH 4,0 y pH 6,5 es más débil que a un pH seleccionado entre pH 6,7 y pH 10,0; preferiblemente significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos a un pH seleccionado entre pH 4,5 y pH 6,5 es más débil que a un pH seleccionado entre pH 6,7 y pH 9,5; más preferiblemente, significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos a un pH seleccionado entre pH 5,0 y pH 6,5 es más débil que a un pH seleccionado entre pH 7,0 y pH 9,0; todavía más preferiblemente significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos a un pH seleccionado entre pH 5,5 y pH 6,5 es más débil que a un pH seleccionado entre pH 7,0 y pH 8,0; en particular preferiblemente significa que la actividad de unión al antígeno al pH en los endosomas tempranos *in vivo* es más débil que la actividad de unión al antígeno al pH del plasma *in vivo*; y específicamente significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos a pH 5,8 es más débil que la actividad de unión al antígeno a pH 7,4.

Se puede determinar si la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos ha cambiado por la condición de pH, por ejemplo, mediante el uso de métodos de medición conocidos tales como los descritos en la sección "Actividad de unión" anterior. Específicamente, la actividad de unión se mide en diferentes condiciones de pH usando los métodos de medición descritos anteriormente. Por ejemplo, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos se compara en las condiciones de intervalo de pH ácido e intervalo de pH neutro para confirmar que la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión a antígenos cambia para ser mayor en condiciones de intervalo de pH neutro que en la condición de intervalo de pH ácido.

Además, la expresión "la actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro" también se puede expresar como "la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, es más alta que en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido". Como se usa en este documento, "la actividad de unión al antígeno en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro" puede describirse como "la actividad de unión al antígeno en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es más débil que la capacidad de unión al antígeno en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro". Como alternativa, "la actividad de unión al antígeno en una condición de alta

concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, se reduce para ser menor que en una condición de baja concentración de protones o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro" puede describirse como "la actividad de unión al antígeno en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, se reduce para ser más débil que la capacidad de unión al antígeno en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro".

Las condiciones distintas de la concentración de protones o el pH para medir la actividad de unión al antígeno pueden ser seleccionadas adecuadamente por los expertos en la técnica y no están en particular limitadas. Las mediciones se pueden realizar, por ejemplo, a 37 °C con tampón HEPES. Las mediciones se pueden realizar, por ejemplo, con Biacore (GE Healthcare). Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos se puede determinar evaluando la actividad de unión al antígeno soluble vertiendo el antígeno como analito en un chip inmovilizado con la molécula de unión a antígenos. Cuando el antígeno es un antígeno de membrana, la actividad de unión al antígeno de membrana puede evaluarse vertiendo la molécula de unión a antígenos como analito en un chip inmovilizado con el antígeno.

Siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento en una condición de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido sea más débil que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, la proporción de la actividad de unión al antígeno entre la que se encuentra en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, y en una condición de baja concentración de protones o alto pH, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, no está en particular limitado, y el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, que es la proporción de la constante de disociación (KD) para un antígeno en una condición de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, a la KD en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, es preferiblemente 2 o más; más preferiblemente, el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es 10 o más; y aún más preferiblemente, el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es 40 o más. El límite superior del valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ no está en particular limitado y puede ser cualquier valor, como 400, 1000 o 10000, siempre que la molécula pueda producirse mediante las técnicas de los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la constante de disociación (KD) se puede utilizar como valor de la actividad de unión al antígeno. Por otra parte, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, se puede usar la constante de disociación aparente (KD). La constante de disociación (KD) y la constante de disociación aparente (KD) pueden medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, y pueden usarse Biacore (GE healthcare), una gráfica de Scatchard, una citómetro de flujo, etc.

Como alternativa, por ejemplo, la constante de velocidad de disociación (kd) puede usarse adecuadamente como un índice para indicar la proporción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento entre la que se encuentra en una condición de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, un intervalo de pH ácido, y una condición de baja concentración de protones o pH alto, es decir, un intervalo de pH neutro. Cuando la kd (constante de velocidad de disociación) se usa como índice para indicar la proporción de actividad de unión en lugar de la KD (constante de disociación), el valor de la kd (en un intervalo de pH ácido)/ kd (en un intervalo de pH neutro), que es la proporción de la kd (constante de velocidad de disociación) para el antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en un intervalo de pH ácido, a la kd (constante de velocidad de disociación) en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en un intervalo de pH neutro, es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 5 o más, aún más preferiblemente 10 o más, y aún más preferiblemente 30 o más. El valor del límite superior de la kd (en una condición de intervalo de pH ácido)/ kd (en una condición de intervalo de pH neutro) no está en particular limitado, y puede ser cualquier valor, como 50, 100 o 200, siempre que la molécula pueda ser producido por las técnicas de los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, se puede usar la constante de velocidad de disociación (kd) como valor de la actividad de unión al antígeno, y cuando el antígeno es un antígeno de membrana, se puede usar la constante de velocidad de disociación aparente (kd). La constante de velocidad de disociación (kd) y la constante de velocidad de disociación aparente (kd) se pueden determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden usar Biacore (GE healthcare), un citómetro de flujo, etc. Cuando se mide la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos a diferentes concentraciones de protones, es decir, pH, las condiciones distintas de la concentración de protones, es decir, el pH, son preferiblemente las mismas.

Por ejemplo, se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, mediante la selección de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos), que comprende las siguientes etapas (a) a (c):

(a) obtener la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en una condición de intervalo de pH ácido;

(b) obtener la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en una condición de intervalo de pH neutro; y

(c) seleccionar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en la condición de intervalo de pH ácido es menor que en la condición de intervalo de pH neutro.

5 Como alternativa, se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, mediante la selección de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos), o un banco de los mismos, que comprende las siguientes etapas (a) a (c):

10 (a) poner en contacto un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos), o un banco de los mismos, en una condición de intervalo de pH neutro con un antígeno;

(b) colocar en una condición de intervalo de pH ácido el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) unido al antígeno en la etapa (a); y

(c) aislar el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) disociado en la etapa (b).

15 Se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, mediante la selección de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos), o un banco de los mismos, que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

20 (a) poner en contacto en un intervalo de pH ácido un antígeno con un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos);

(b) seleccionar el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) que no se une al antígeno en la etapa (a);

25 (c) permitir que el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) seleccionado en la etapa (b) se una al antígeno en un intervalo de pH neutro; y

(d) aislar el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) unido al antígeno en la etapa (c).

30 Se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, mediante un método de selección que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

(a) poner en contacto en un intervalo de pH neutro un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) con una columna inmovilizada con un antígeno;

(b) eluir de la columna en una condición de intervalo de pH ácido el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) unido a la columna en la etapa (a); y

35 (c) aislar el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) eluido en la etapa (b).

Se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de baja concentración de protones o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, mediante un método de selección que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

40 (a) permitir, en una condición de intervalo de pH ácido, que un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) pase por una columna inmovilizada con un antígeno;

(b) recoger el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) eluido sin que se haya unido a la columna en la etapa (a);

45 (c) permitir que el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) recogido en la etapa (b) se una al antígeno en una condición de intervalo de pH neutro; y

(d) aislar el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) unido al antígeno en la etapa (c).

50 Se puede obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, mediante un método de detección que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

(a) poner en contacto un antígeno con un banco de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) en una condición de intervalo de pH neutro;

(b) obtener el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) unido al antígeno en la etapa (a);

5 (c) colocar en un intervalo de pH ácido el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) obtenido en la etapa (b); y

(d) aislar el dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en la etapa (c) es más débil que el patrón seleccionado en la etapa (b).

10 Las etapas descritas anteriormente se pueden repetir dos o más veces. Por tanto, la presente descripción proporciona dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en una condición de intervalo de pH ácido es menor que en una condición de intervalo de pH neutro, que se obtienen mediante un método de selección que comprende además las etapas de repetir dos o más veces las etapas (a) a (c) o (a) a (d) en los métodos de selección descritos anteriormente. El número de veces que se repiten las etapas (a) a (c) o (a) a (d) no está en particular limitado; sin embargo, el número es 10 o menos en general.

15 En los métodos de selección descritos en este documento, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en una condición de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en un intervalo de pH ácido, no está en particular limitada, siempre que tenga la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5, e incluya la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,5 y 6,6 como el pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye la actividad a un pH de entre 5,0 y 6,5, y la actividad a un pH de entre 5,5 y 6,5 como otro pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye la actividad al pH en los endosomas tempranos *in vivo* como el pH más preferido, y específicamente, la actividad a pH 5,8. Por otra parte, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) en condiciones de baja concentración de protones o pH alto, es decir, en un intervalo de pH neutro, no está en particular limitada, siempre que tenga la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10, e incluya la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 9,5 como el pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye la actividad a un pH de entre 7,0 y 9,5 y la actividad a un pH de entre 7,0 y 8,0 como otro pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye la actividad al pH del plasma *in vivo* como el pH más preferido, y específicamente, la actividad a pH 7,4.

30 La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) puede medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden determinar adecuadamente otras condiciones distintas de la concentración de calcio ionizado. La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) se puede evaluar basándose en la constante de disociación (KD), la constante de disociación aparente (KD), la constante de velocidad de disociación (kd), la constante de velocidad de disociación aparente (kd), y similares. Estas se pueden determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE healthcare), una gráfica de Scatchard o FACS.

35 La etapa de seleccionar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de baja concentración de protones o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, es más alta que en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es sinónimo de la etapa de seleccionar un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en una condición de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, es menor que en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro.

40 Siempre que la actividad de unión al antígeno en condiciones de baja concentración de protones o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, sea más alta que en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, la diferencia entre la actividad de unión al antígeno en una condición de concentración de protones baja o pH alto, es decir, una condición de intervalo de pH neutro, y la actividad en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, una condición de intervalo de pH ácido, no está en particular limitada; sin embargo, la actividad de unión al antígeno en condiciones de baja concentración de protones o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, es preferiblemente dos o más veces mayor, más preferiblemente 10 o más veces mayor, y aún más preferiblemente 40 o más veces mayor que en una condición de alta concentración de protones o pH bajo, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido.

55 El dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) como se describe en el presente documento que se selecciona mediante los métodos de selección descritos anteriormente puede ser cualquier dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) y, por ejemplo, puede seleccionarse un dominio de unión al antígeno mencionado anteriormente. (o molécula de unión a antígenos). Por ejemplo, pueden seleccionarse dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) que tienen una secuencia nativa, y también pueden seleccionarse dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) en los que se han sustituido sus secuencias de aminoácidos.

El dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) como se describe en el presente documento para ser seleccionado mediante los métodos de selección descritos anteriormente se puede preparar de cualquier manera.

Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos preexistentes, bancos preexistentes (banco de fagos, etc.), anticuerpos o bancos preparados a partir de células B de animales inmunizados o de hibridomas obtenidos inmunizando animales, anticuerpos o bancos (bancos con mayor contenido de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, bancos introducidos con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o mutaciones de aminoácidos no naturales en posiciones específicas, etc.) obtenidos introduciendo aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o mutaciones de aminoácidos no naturales en los anticuerpos o bancos descritos anteriormente.

Los métodos para obtener un dominio de unión al antígeno (o molécula de unión a antígenos) cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de baja concentración de protones o pH alto, es decir, en una condición de intervalo de pH neutro, es más alta que en una condición de alta concentración de protones o bajo pH, es decir, en una condición de intervalo de pH ácido, a partir de dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) preparados a partir de hibridomas obtenidos inmunizando animales o a partir de células B de animales inmunizados incluyen, preferiblemente, por ejemplo, la molécula de unión a antígenos o el anticuerpo en el que al menos uno de los aminoácidos del dominio de unión al antígeno o del anticuerpo está sustituido por un aminoácido con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o una mutación de un aminoácido no natural, o el dominio de unión al antígeno o el anticuerpo insertado con un aminoácido con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácido no natural, tales como los descritos en la Publicación Internacional n.º WO 2009/125825.

Los sitios de introducción de mutaciones de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales no están en particular limitados y pueden estar en cualquier posición siempre que la actividad de unión al antígeno en un intervalo de pH ácido sea más débil que en un intervalo de pH neutro (el valor de KD (en un intervalo de pH ácido)/KD (en un intervalo de pH neutro) o kd (en un intervalo de pH ácido)/kd (en un intervalo de pH neutro) aumenta) en comparación con antes de la sustitución o inserción. Por ejemplo, cuando la molécula de unión a antígenos es un anticuerpo, la región variable del anticuerpo y las CDR son adecuadas. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente el número de aminoácidos a sustituir o el número de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales a insertar. Es posible sustituir un solo aminoácido que tenga un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o un solo aminoácido no natural; es posible insertar un único aminoácido que tenga un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o un único aminoácido no natural; es posible sustituir dos o más aminoácidos que tengan un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o dos o más aminoácidos no naturales; y es posible insertar dos o más aminoácidos que tengan un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o dos o más aminoácidos no naturales. Como alternativa, se pueden eliminar, agregar, insertar y/o sustituir otros aminoácidos de forma concomitante, además de la sustitución por aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, o la inserción de aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0 a 8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales. La sustitución o inserción de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales se puede realizar aleatoriamente mediante métodos como el barrido de histidina, en el que la alanina del barrido escaneo de alanina conocido por los expertos en la técnica se reemplaza por histidina. Pueden seleccionarse moléculas de unión a antígenos que exhiben un valor mayor de KD (en un intervalo de pH ácido)/KD (en un intervalo de pH neutro) o kd (en un intervalo de pH ácido)/kd (en un intervalo de pH neutro) en comparación con antes de la mutación, de dominios de unión al antígeno o anticuerpos introducidos con inserciones aleatorias o mutaciones de sustitución de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales.

Los ejemplos preferidos de moléculas de unión a antígenos que contienen la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales como se describe anteriormente y cuya actividad de unión al antígeno en un intervalo de pH ácido es más baja que en un intervalo de pH neutro incluyen moléculas de unión a antígenos cuya actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro después de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales es comparable a la de antes de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales. En este documento, "una molécula de unión a antígenos después de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales tiene una actividad de unión al antígeno comparable a la que tenía antes de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales" significa que cuando se toma la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos antes de la mutación con aminoácidos que tienen una cadena lateral pKa de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales como 100 %, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos después de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (para ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales es al menos 10 % o mayor, preferiblemente 50 % o mayor, más preferiblemente 80 % o mayor, y aún más preferiblemente 90 % o mayor. La actividad de unión al antígeno después de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales a pH 7,4 puede ser mayor que antes de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por

ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales a pH 7,4. Si la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos disminuye debido a la inserción o sustitución por aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, puede hacerse que la actividad de unión al antígeno sea comparable a la anterior a la inserción o sustitución por aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales mediante la introducción de una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos de la molécula de unión a antígenos. La presente descripción también incluye moléculas de unión a antígenos cuya actividad de unión se ha ajustado para que sea comparable mediante sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos después de la sustitución o inserción de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0- 8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales.

Aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de protones

Pueden prepararse dominios de unión al antígeno (o moléculas de unión a antígenos) como se describe en el presente documento para ser seleccionados mediante los métodos de selección descritos anteriormente de cualquier manera. Por ejemplo, cuando la condición de concentración de iones es una condición de concentración de protones o una condición de pH, se pueden usar anticuerpos preexistentes, bancos preexistentes (banco de fagos, etc.), anticuerpos o bancos preparados a partir de células B de animales inmunizados o a partir de hibridomas obtenidos inmunizando animales, anticuerpos o bancos (bancos con mayor contenido de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, bancos introducidos con mutaciones de aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales en posiciones específicas, etc.) obtenidos mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos con una cadena lateral pKa de 4,0-8,0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales en los anticuerpos o bancos descritos anteriormente.

En una realización, también se puede construir un banco que contiene múltiples moléculas de unión a antígenos como se describe en este documento, cuyas secuencias son diferentes entre sí, combinando regiones variables de cadena pesada, producidas como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas, con regiones variables de cadena ligera introducidas con " al menos un resto aminoácido que cambia la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de la condición de concentración de protones".

Dichos restos aminoácidos incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a restos aminoácidos contenidos en la CDR1 de cadena ligera. Los restos aminoácidos también incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a restos aminoácidos contenidos en la CDR2 de cadena ligera. Los restos aminoácidos también incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a restos aminoácidos contenidos en la CDR3 de cadena ligera.

Los restos aminoácidos descritos anteriormente contenidos en la CDR1 de cadena ligera incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a los restos aminoácidos de las posiciones 24, 27, 28, 31, 32 y/o 34 según la numeración de Kabat en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera. Por otra parte, los restos aminoácidos contenidos en la CDR2 de cadena ligera incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a los restos aminoácidos de las posiciones 50, 51, 52, 53, 54, 55 y/o 56 según la numeración de Kabat en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera. Además, los restos aminoácidos en la CDR3 de cadena ligera incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a los restos aminoácidos de las posiciones 89, 90, 91, 92, 93, 94 y/o 95A según la numeración de Kabat en la CDR3 de la región variable de la cadena ligera. Además, los restos aminoácidos pueden estar contenidos por sí solos o pueden estar contenidos en combinación de dos o más aminoácidos siempre que permitan el cambio en la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de la condición de concentración de protones.

Incluso cuando la región variable de la cadena pesada producida como un banco de secuencias de regiones variables aleatorizadas se combina con la región variable de la cadena ligera descrita anteriormente introducida con "al menos un resto aminoácido que cambia la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de la condición de concentración de protones", es posible realizar un diseño de manera que los restos flexibles estén contenidos en la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la misma manera que se describió anteriormente. El número y la posición de los restos flexibles no se limitan en particular a una realización específica, siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento cambie dependiendo de la condición de concentración de protones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o de FR de cadena pesada y/o cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles. Por ejemplo, los restos flexibles que se van a introducir en las secuencias de las regiones variables de cadena ligera incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a los restos aminoácidos enumerados en las tablas 3 y 4. Por otra parte, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera distintas de los restos flexibles y los restos aminoácidos que cambian la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de la condición de concentración de protones incluyen, de modo adecuado, aunque sin limitarse a secuencias de la línea germinal, como Vk1 (SEQ ID NO:3), Vk2 (SEQ ID NO:4), Vk3 (SEQ ID NO:5) y Vk4 (SEQ ID NO:6).

Tabla 3

Posición		Aminoácido									
CDR1											
28	S: 100 %										
29	1:100 %										
30	N: 25 %	S: 25 %	R: 25 %	H: 25 %							
31	S: 100 %										
32	H: 100 %										
33	L: 100 %										
34	A: 50 %	N: 50 %									
CDR2											
50	H: 100 %					o	R: 25 %	D: 25 %	G: 25 %	K: 25 %	
51	A: 100 %						A: 100 %				
52	S: 100 %						S: 100 %				
53	K: 33,3 %	N: 33,3 %	S: 33,3 %				H: 100 %				
54	L: 100 %						L: 100 %				
55	Q: 100 %						Q: 100 %				
56	S: 100 %						S: 100 %				
CDR3											
90	Q: 100 %					o	Q: 100 %				
91	H: 100 %						S: 33,3 %	R: 33,3 %	Y: 33,3 %		
92	G: 25 %	N: 25 %	S: 25 %	Y: 25 %			H: 100 %				
93	H: 33,3 %	N: 33,3 %	S: 33,3 %				H: 33. 3 %	N: 33,3 %	S: 33,3 %		
94	S: 50 %	Y: 50 %					S: 50 %	Y: 50 %			
95	P: 100 %						P: 100 %				
96	L: 50 %	Y: 50 %					L: 50 %	Y: 50 %			
(La posición indica la numeración de Kabat)											
Cuando la posición 92 indicada por la numeración de Kabat es Asn (N), se puede excluir Ser (S) en la posición 94.											

Tabla 4

CDR	Posición	Aminoácido				
CDR1	28	S: 100 %				
	29	I: 100 %				
	30	H: 30 %	N: 10 %	S: 50 %	R: 10 %	
	31	N: 35 %	S: 65 %			
	32	H: 40 %	N: 20 %	Y: 40 %		
	33	L: 100 %				
	34	R: 70 %	N: 30 %			
CDR2	50	R: 25 %	D: 15 %	G: 25 %	H: 30 %	K: 5 %
	51	A: 100 %				
	52	S: 100 %				

CDR	Posición	Aminoácido				
	53	H: 30 %	K: 10 %	N: 15 %	S: 45 %	
	54	L: 100 %				
	55	Q: 100 %				
	56	S: 100 %				
CDR3	90	Q: 100 %				
	91	H: 30 %	S: 15 %	R: 10 %	Y: 45 %	
	92	G: 20 %	H: 30 %	N: 20 %	S: 15 %	Y: 15 %
	93	H: 30 %	N: 25 %	S: 45 %		
	94	S: 50 %	Y: 50 %			
	95	P: 100 %				
	96	L: 50 %	Y: 50 %			
(La posición indica la numeración de Kabat) Cuando la posición 92 indicada por la numeración de Kabat es Asn (N), se puede excluir Ser (S) en la posición 94.						

Cualquier resto aminoácido puede usarse adecuadamente como los restos aminoácidos descritos anteriormente que cambian la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión a antígenos dependiendo de la condición de concentración de protones. Específicamente, tales restos aminoácidos incluyen aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 4,0-8,0. Dichos aminoácidos liberadores de electrones incluyen preferiblemente, por ejemplo, aminoácidos de origen natural tales como histidina y ácido glutámico, así como aminoácidos no naturales tales como análogos de histidina (documento US2009/0035836), m-NO₂-Tyr (pKa 7,45), 3,5-Br₂-Tyr (pKa 7,21) y 3,5-I₂-Tyr (pKa 7,38) (Bioorg. Medicina. Chem. (2003), 11 (17), 3761-3768). Los restos aminoácidos particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, aminoácidos con un pKa de cadena lateral de 6,0 a 7,0. Dichos restos aminoácidos que liberan electrones incluyen preferiblemente, por ejemplo, histidina.

Se pueden emplear métodos conocidos, tal como la mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82, 488-492)) y la PCR de extensión por solapamiento, de manera apropiada para alterar los aminoácidos de los dominios de unión al antígeno. Además, también se pueden utilizar varios métodos conocidos como método de alteración de aminoácidos para sustituir aminoácidos por otros distintos de los aminoácidos naturales (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006), 35: 225-249; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003), 100 (11): 6353-6357). Por ejemplo, se puede usar, de modo adecuado, un sistema de traducción sin células (Clover Direct (Protein Express)) que contiene ARNt en el que el ARNt supresor ámbar, que es complementario con el codón UAG (codón ámbar) que es un codón de fin, está unido a un aminoácido no natural.

La región variable de cadena pesada preferida que se usa en combinación incluye, por ejemplo, bancos de regiones variables aleatorizadas. Los métodos conocidos se combinan de forma apropiada como método para producir un banco de regiones variables aleatorizadas. En una realización no limitante, puede usarse, de modo adecuado, un banco inmunológico construido a partir de genes de anticuerpos derivados de animales inmunizados con antígenos específicos, pacientes con infección o personas con una titulación de anticuerpos elevada en sangre como resultado de la vacunación, pacientes con cáncer o linfocitos de enfermedades autoinmunes, como un banco de regiones variables aleatorizadas.

En otra realización no limitante, de la misma manera que se describió anteriormente, también se puede usar de manera adecuada un banco sintético en el que las secuencias de CDR de genes V de ADN genómico o genes V reconstruidos funcionales se reemplazan por un conjunto de oligonucleótidos sintéticos que contienen las secuencias que codifican conjuntos de codones de una longitud apropiada como un banco de regiones variables aleatorizadas. En este caso, la secuencia de CDR3 por sí sola puede reemplazarse porque se observa variedad en la secuencia de genes de CDR3 de cadena pesada. La base para dar lugar a variaciones de aminoácidos en la región variable de una molécula de unión a antígenos consiste en generar variaciones de restos aminoácidos de posiciones expuestas en la superficie de la molécula de unión a antígenos. La posición expuesta en la superficie se refiere a una posición en la que un aminoácido se expone sobre la superficie y/o se pone en contacto con un antígeno en función de la conformación, el ensamblaje estructural y/o la estructura modelada de una molécula de unión a antígenos y, en general, tales posiciones son los CDR. Las posiciones expuestas en la superficie se determinan preferiblemente usando las coordenadas derivadas de un modelo tridimensional de la molécula de unión a antígenos usando programas informáticos tales como el programa InsightII (Accelrys). Las posiciones expuestas en la superficie se pueden determinar utilizando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (J. Mol. Biol. (1971), 55, 379-400); Connolly (J. Appl. Cryst. (1983), 16, 548-558)). Las posiciones expuestas en la superficie se pueden determinar basándose en la información sobre la estructura tridimensional de los anticuerpos utilizando un software adecuado para la formación de modelos

de proteínas. El software que se utiliza adecuadamente para este propósito incluye el software del módulo de biopolímeros SYBYL (Tripos Associates). Cuando el algoritmo requiere el parámetro de tamaño de entrada del usuario, el "tamaño" de la sonda para su uso en el cálculo se establece general o preferiblemente en aproximadamente 1,4 angstrom o menos de radio. Además, Pacios (Comput. Chem. (1994), 18 (4), 377-386; y J. Mol. Model. (1995), 1, 46-53) describe un método para determinar la región y el área expuestas en la superficie utilizando software para ordenador personal.

En otra realización no limitante más, también se puede utilizar de manera en particular adecuada un banco sin exposición construido a partir de genes de anticuerpos derivados de linfocitos de personas sanas y que consta de secuencias sin exposición, que son un repertorio no sesgado de secuencias de anticuerpos, como un banco de regiones variables aleatorizadas (Gejima *et al.* (Human antibodies (2002), 11, 121-129); y Cardoso *et al.* (Scand. J. Immunol. (2000), 51, 337-344)).

Región Fc

Una región Fc contiene la secuencia de aminoácidos derivada de la región constante de cadena pesada de un anticuerpo. Una región Fc es una porción de la región constante de cadena pesada de un anticuerpo, comenzando desde el extremo N terminal de la región bisagra, que corresponde al sitio de escisión de papaína en un aminoácido alrededor de la posición 216 según el sistema de numeración EU, y contiene los dominios bisagra, CH2 y CH3. Si bien la región Fc puede obtenerse a partir de IgG1 humana, no se limita a una subclase particular de IgG. Como se describe más adelante, un ejemplo favorable de la región Fc es una región Fc que tiene una actividad de unión a FcRn en un intervalo de pH ácido. Además, un ejemplo favorable de la región Fc es una región Fc que tiene una actividad de unión al receptor Fcγ como se describe más adelante. Una realización no limitante de dicha región Fc es, por ejemplo, la región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:9), IgG2 (SEQ ID NO:10), IgG3 (SEQ ID NO:11) o IgG4 (SEQ ID NO:12). Varias secuencias de alotipos de regiones constantes de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana debidos a polimorfismos genéticos se describen en "Sequences of proteins of immunological interest", publicación de NIH nº 91-3242. Cualquiera de estas secuencias puede usarse en la presente descripción. En particular, para la secuencia de IgG1 humana, la secuencia de aminoácidos en las posiciones 356 a 358, como se indica mediante la numeración EU, puede ser DEL o EEM. Además, una región Fc no tiene que derivarse de la región constante de IgG humana antes descrita, siempre que contenga un dominio que se una a FcγR y/o FcRn.

FcRn

A diferencia del receptor Fcγ que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, el FcRn humano es estructuralmente similar a los polipéptidos del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I, y presenta una identidad de secuencia del 22 % al 29 % con las moléculas del MHC de clase I (Ghetie *et al.*, Immunol. Today (1997), 18 (12): 592-598). El FcRn se expresa como un heterodímero que consiste en la cadena ligera o β soluble (microglobulina β2) complejada con la cadena pesada o α transmembrana. Al igual que el MHC, la cadena α de FcRn comprende tres dominios extracelulares (α1, α2 y α3) y su dominio citoplasmático corto ancla la proteína sobre la superficie celular. Los dominios α1 y α2 interactúan con el dominio de unión a FcRn de la región Fc del anticuerpo (Raghavan *et al.*, Immunity (1994), 1: 303-315).

El FcRn se expresa en la placenta materna y en el saco vitelino de los mamíferos y participa en la transferencia de IgG de la madre al feto. Además, en el intestino delgado neonatal de los roedores, en donde se expresa FcRn, el FcRn participa en la transferencia de IgG materna a través del epitelio del borde en cepillo desde el calostro o la leche ingeridos. El FcRn se expresa en una variedad de otros tejidos y sistemas de células endoteliales de varias especies. El FcRn también se expresa en endotelios humanos adultos, vasos sanguíneos musculares y capilares sinusoidales hepáticos. Se cree que el FcRn desempeña un papel en el mantenimiento de la concentración de IgG en plasma mediando el reciclaje de IgG al suero tras la unión a IgG. Normalmente, la unión de FcRn a moléculas de IgG depende estrictamente del pH. La unión óptima se observa en un intervalo de pH ácido por debajo de 7,0.

El FcRn humano cuyo precursor es un polipéptido que tiene la secuencia señal de SEQ ID NO:13 (el polipéptido con la secuencia señal se muestra en SEQ ID NO:14) forma un complejo con β2-microglobulina humana *in vivo*. El FcRn humano soluble complejado con β2-microglobulina se produce utilizando técnicas de expresión recombinante convencionales. Las regiones Fc como se describen en el presente documento pueden evaluarse por su actividad de unión a dicho FcRn humano soluble complejado con β2-microglobulina. A menos que se especifique lo contrario, el FcRn humano se refiere a una forma capaz de unirse a una región Fc como se describe en el presente documento. Los ejemplos incluyen un complejo entre el FcRn humano y la β2-microglobulina humana.

Actividad de unión de la región Fc a FcRn, en particular, FcRn humano

La actividad de unión de una región Fc a FcRn, en particular al FcRn humano, puede medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, como se describe en la sección "Actividad de unión" anterior. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente otras condiciones distintas del pH. La actividad de unión al antígeno y la actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión a antígenos se pueden evaluar basándose en la constante de disociación (KD), la constante de disociación aparente (KD), la velocidad de disociación (kd), la velocidad de disociación aparente (kd) y similares. Estas pueden medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la

técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar Biacore (GE healthcare), una gráfica de Scatchard o un citómetro de flujo.

Quando se mide la actividad de unión a FcRn humano de una región Fc, las condiciones que son distintas del pH no están en particular limitadas y los expertos en la técnica pueden seleccionarla de manera apropiada. Las mediciones se pueden realizar, por ejemplo, a 37 °C usando tampón MES, como se describe en la Publicación Internacional n.º WO 2009/125825. Como alternativa, la actividad de unión a FcRn humano de una región Fc como se describe en el presente documento puede medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, y puede medirse usando, por ejemplo, Biacore (GE Healthcare) o similar. La actividad de unión de una región Fc a FcRn humano se puede evaluar vertiendo, como analito, FcRn humano, una región Fc o una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento que contiene la región Fc en un chip inmovilizado con una región Fc, una molécula de unión a antígenos que contiene la región Fc, o FcRn humano.

Un intervalo de pH neutro como condición en la que la región Fc contenida en una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento tiene la actividad de unión a FcRn significa pH 6,7 a pH 10,0 en general. Preferiblemente, el intervalo de pH neutro es un intervalo indicado con valores de pH arbitrarios entre pH 7,0 y pH 8,0, y se selecciona preferiblemente de pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 y 8,0, y es en particular preferiblemente pH 7,4 que está cerca del pH del plasma (sangre) *in vivo*. Cuando la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano a pH 7,4 es demasiado baja para evaluarla, puede usarse pH 7,0 en lugar de pH 7,4. En este documento, un intervalo de pH ácido como condición en la que la región Fc contenida en una molécula de unión a antígenos como se describe en la presente tiene la actividad de unión a FcRn significa pH 4,0 a pH 6,5 en general. Preferiblemente, el intervalo de pH ácido significa pH 5,5 a pH 6,5, en particular preferiblemente pH 5,8 a pH 6,0 que está cerca del pH en los endosomas tempranos *in vivo*. Con respecto a la temperatura utilizada como condición de medición, la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano puede evaluarse a cualquier temperatura entre 10 °C y 50 °C. Preferiblemente, la afinidad de unión entre el dominio de unión al FcRn humano y el FcRn humano se puede determinar entre 15 °C y 40 °C. Más preferiblemente, la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano se puede determinar de la misma manera a una temperatura arbitraria entre 20 °C y 35 °C, tal como una temperatura cualquiera de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 °C. En una realización, la temperatura incluye, pero no se limita a, por ejemplo, 25 °C.

De acuerdo con Journal of Immunology (2009), 182, 7663-7671, la actividad de unión al FcRn humano de la IgG1 humana nativa en un intervalo de pH ácido (pH 6,0) es 1,7 µM (KD), y la actividad es casi indetectable en un intervalo de pH neutro. Por tanto, en una realización preferida, pueden seleccionarse moléculas de unión a antígenos que comprenden una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en un intervalo de pH ácido es 20 µM (KD) o más fuerte. En una realización más preferida, pueden seleccionarse las moléculas de unión a antígenos que comprenden una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en un intervalo de pH ácido es 2,0 µM (KD) o más fuerte. En una realización aún más preferida, pueden seleccionarse las moléculas de unión a antígenos que comprenden una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en un intervalo de pH ácido es 0,5 µM (KD) o más fuerte. Los valores de KD mencionados anteriormente se determinan mediante el método descrito en Journal of Immunology (2009), 182: 7663-7671 (inmovilizando la molécula de unión a antígenos sobre un chip y cargando FcRn humano como analito).

Las regiones Fc preferidas tienen una actividad de unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido. Cuando una región Fc tiene originalmente una actividad de unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido, el dominio se puede usar tal cual. Cuando el dominio tiene una actividad de unión a FcRn débil o nula en una condición de intervalo de pH ácido, se puede obtener una región Fc que tenga una actividad de unión a FcRn deseada alterando los aminoácidos de una molécula de unión a antígenos. Las regiones Fc que tienen una actividad de unión a FcRn deseada o mejorada en una condición de intervalo de pH ácido también pueden obtenerse de forma adecuada alterando los aminoácidos de una región Fc. Se pueden descubrir las alteraciones de aminoácidos de una región Fc que dan como resultado dicha actividad de unión deseada comparando la actividad de unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido antes y después de la alteración de los aminoácidos. Los expertos en la técnica pueden alterar apropiadamente los aminoácidos usando técnicas conocidas similares a las técnicas mencionadas anteriormente usadas para alterar la actividad de unión al receptor Fcγ.

Las regiones Fc comprendidas en las moléculas de unión a antígenos como se describen en este documento, que tienen una actividad de unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido, se pueden obtener mediante cualquier método. Específicamente, los dominios de unión a FcRn que tienen una actividad de unión a FcRn o una actividad de unión a FcRn mejorada en una condición de intervalo de pH ácido pueden obtenerse alterando los aminoácidos de una inmunoglobulina humana de tipo IgG utilizada como región Fc de partida. Las regiones Fc preferidas de una inmunoglobulina de tipo IgG para su alteración incluyen, por ejemplo, las de las IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y variantes de las mismas). Siempre que la región Fc tenga una actividad de unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido o pueda aumentar la actividad de unión a FcRn humano en una condición de intervalo de pH ácido, los aminoácidos en cualquier posición se pueden alterar por otros aminoácidos. Cuando la molécula de unión a antígenos contiene la región Fc de la IgG1 humana como región Fc, es preferible que la región Fc resultante contenga una alteración que produzca el efecto de mejorar la unión a FcRn en condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de IgG1 humana de partida. Los aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen, por ejemplo, al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 252, 254, 256, 309, 311, 315, 433 y 434 según la numeración EU, y su combinación de aminoácidos de al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 253, 310, 435 y 426 como se describe en el documento WO

1997/034631. Los ejemplos favorables incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y 447 según lo indicado por la numeración EU como se describe en el documento WO 2000/042072. De manera similar, los ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 y 436 de acuerdo con la numeración EU como se describe en el documento WO 2002/060919. Además, los aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen, por ejemplo, los aminoácidos de las posiciones 250, 314 y 428 según la numeración EU como se describe en el documento WO2004/092219. Además, los ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 238, 244, 245, 249, 252, 256, 257, 258, 260, 262, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 307, 311, 312, 316, 317, 318, 332, 339, 341, 343, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 423, 427, 430, 431, 434, 436, 438, 440 y 442 como se describe en el documento WO 2006/020114. Además, los ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen los aminoácidos de las posiciones 251, 252, 307, 308, 378, 428, 430, 434 y/o 436 según la numeración EU como se describe en el documento WO 2010/045193. La alteración de estos aminoácidos potencia la unión a FcRn de la región Fc de una inmunoglobulina de tipo IgG en una condición de intervalo de pH ácido.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que produce el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de IgG1 humana de partida incluye al menos una o más alteraciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

Arg o Leu para el aminoácido en la posición 251;

Phe, Ser, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 252;

Ser o Thr para el aminoácido en la posición 254;

Arg, Gly, Ile o Leu para el aminoácido en la posición 255;

Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu o Thr para el aminoácido en la posición 256;

Ile o Thr para el aminoácido en la posición 308;

Pro para el aminoácido en la posición 309;

Glu, Leu o Ser para el aminoácido en la posición 311;

Ala o Asp para el aminoácido en la posición 312;

Ala o Leu para el aminoácido en la posición 314;

Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 385;

Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 386;

Ala, Arg, His, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 387;

Asn, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 389;

Leu, Met, Phe, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 428;

Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 433;

His, Phe o Tyr para el aminoácido en la posición 434; y

Arg, Asn, His, Lys, Met o Thr para el aminoácido en la posición 436, como indica la numeración EU. Por otra parte, El número de aminoácidos que se van a alterar no está en particular limitado; y el aminoácido se puede alterar en un solo sitio o los aminoácidos se pueden alterar en dos o más sitios.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de mejorar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser unas alteraciones que incluyen Ile para el aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido en la posición 309 y/o Glu para el aminoácido en la posición 311 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Thr para el aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido en la posición 309, Leu para el aminoácido en la posición 311, Ala para el aminoácido en la posición 312 y/o Ala para el aminoácido en la posición 314. Además, otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Ile o Thr para el aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido en la posición 309, Glu, Leu o Ser para el aminoácido en la posición 311, Ala para el aminoácido en la posición 312 y/o Ala o Leu para el aminoácido en la posición 314. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Thr para el

aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido ácido en la posición 309, Ser para el aminoácido en la posición 311, Asp para el aminoácido en la posición 312 y/o Leu para el aminoácido en la posición 314.

5 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser unas alteraciones que incluyen Leu para el aminoácido en la posición 251, Tyr para el aminoácido en la posición 252, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 254, Arg para el aminoácido en la posición 255 y/o Glu para el aminoácido. ácido en la posición 256 de acuerdo con la numeración EU.

10 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser al menos una o más alteraciones seleccionadas del grupo de alteraciones que incluye Leu, Met, Phe, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 428, Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro o Ser para la aminoácido en la posición 433, His, Phe o Tyr para el aminoácido en la posición 434, y/o Arg, Asn, His, Lys, Met o Thr para el aminoácido en la posición 436 según la numeración EU.

15 Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir His o Met para el aminoácido en la posición 428 y/o His o Met para el aminoácido en la posición 434.

20 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser unas alteraciones que incluyen Arg para el aminoácido en la posición 385, Thr para el aminoácido en la posición 386, Arg para el aminoácido en la posición 387 y/o Pro para el aminoácido en la posición 389 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Asp para el aminoácido en la posición 385, Pro para el aminoácido en la posición 386 y/o Ser para el aminoácido en la posición 389.

25 Además, cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de mejorar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida incluye al menos una o más alteraciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

Gln o Glu para el aminoácido en la posición 250; y

30 Leu o Phe para el aminoácido en la posición 428 según la numeración EU. El número de aminoácidos que se va a alterar no está en particular limitado; y el aminoácido se puede alterar en un solo sitio o los aminoácidos se pueden alterar en dos sitios.

35 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser unas alteraciones que incluyen Gln para el aminoácido en la posición 250 y/o Leu o Phe para el aminoácido en la posición 428 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Glu para el aminoácido en la posición 250 y/o Leu o Phe para el aminoácido en la posición 428.

40 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provocar el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida incluye al menos dos o más alteraciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

Asp o Glu para el aminoácido en la posición 251;

Tyr para el aminoácido en la posición 252;

Gln para el aminoácido en la posición 307;

45 Pro para el aminoácido en la posición 308;

Val para el aminoácido en la posición 378;

Ala para el aminoácido en la posición 380;

Leu para el aminoácido en la posición 428;

Ala o Lys para el aminoácido en la posición 430;

50 Ala, His, Ser o Tyr para el aminoácido en la posición 434; e

Ile para el aminoácido en la posición 436, como lo indica la numeración EU. El número de aminoácidos que se van a

alterar no está en particular limitado; y los aminoácidos se pueden alterar en solo dos sitios o los aminoácidos se pueden alterar en tres o más sitios.

5 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser unas alteraciones que incluyen Gln para el aminoácido en la posición 307 y Ala o Ser para el aminoácido en la posición 434 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Pro para el aminoácido en la posición 308 y Ala para el aminoácido en la posición 434. Además, otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Tyr para el aminoácido en la posición 252, y Ala para el aminoácido en la posición 434. Una realización no limitante
10 diferente de esta alteración puede incluir Val para el aminoácido en la posición 378, y Ala para el aminoácido en la posición 434. Otra realización diferente no limitante de esta alteración puede incluir Leu para el aminoácido en la posición 428 y Ala para el aminoácido en la posición 434. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Ala para el aminoácido en la posición 434 e Ile para el aminoácido en la posición 436. Además, otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Pro para el aminoácido en la posición 308 y Tyr para el aminoácido en la posición 434. Además, otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Gln para el aminoácido en la posición 307 e Ile para el aminoácido en la posición 436.

20 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser unas alteraciones que incluyen cualquiera de Gln para el aminoácido en la posición 307, Ala para el aminoácido en la posición 380 y Ser para el aminoácido en la posición 434 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Gln para el aminoácido en la posición 307, Ala para el aminoácido en la posición 380 y Ala para el aminoácido en la posición 434. Además, otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Tyr para el aminoácido en la posición 252, Pro para el aminoácido en la posición 308 y Tyr para el aminoácido en la posición 434. Una realización
25 diferente no limitante de esta alteración puede incluir Asp para el aminoácido en la posición 251, Gln para el aminoácido en la posición 307 y His para el aminoácido en la posición 434.

30 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida incluye la alteración de al menos dos o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

Leu para el aminoácido en la posición 238;

Leu para el aminoácido en la posición 244;

Arg para el aminoácido en la posición 245;

Pro para el aminoácido en la posición 249;

35 Tyr para el aminoácido en la posición 252;

Pro para el aminoácido en la posición 256;

Ala, Ile, Met, Asn, Ser o Val para el aminoácido en la posición 257;

Asp para el aminoácido en la posición 258;

Ser para el aminoácido en la posición 260;

40 Leu para el aminoácido en la posición 262;

Lys para el aminoácido en la posición 270;

Leu o Arg para el aminoácido en la posición 272;

Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 279;

Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 283;

45 Asn para el aminoácido en la posición 285;

Phe para el aminoácido en la posición 286;

Asn o Pro para el aminoácido en la posición 288;

Val para el aminoácido en la posición 293;

- Ala, Glu o Met para el aminoácido en la posición 307;
- Ala, Ile, Lys, Leu, Met, Val o Trp para el aminoácido en la posición 311;
- Pro para el aminoácido en la posición 312;
- Lys para el aminoácido en la posición 316;
- 5 Pro para el aminoácido en la posición 317;
- Asn o Thr para el aminoácido en la posición 318;
- Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser o Trp para el aminoácido en la posición 332;
- Asn, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 339;
- Pro para el aminoácido en la posición 341;
- 10 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 343;
- Arg para el aminoácido en la posición 375;
- Gly, Ile, Met, Pro, Thr o Val para el aminoácido en la posición 376;
- Lys para el aminoácido en la posición 377;
- Asp o Asn para el aminoácido en la posición 378;
- 15 Asn, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 380;
- Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 382;
- Asn para el aminoácido en la posición 423;
- Asn para el aminoácido en la posición 427;
- Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 430;
- 20 His o Asn para el aminoácido en la posición 431;
- Phe, Gly, His, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434;
- Ile, Leu o Thr para el aminoácido en la posición 436;
- Lys, Leu, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 438;
- Lys para el aminoácido en la posición 440; y
- 25 Lys para el aminoácido en la posición 442 según la numeración EU. El número de aminoácidos que se van a alterar no está en particular limitado y pueden alterarse aminoácidos en solo dos sitios y pueden alterarse aminoácidos en tres o más sitios.
- 30 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como la región Fc, una realización no limitante de la alteración que provoca el efecto de potenciar la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida puede ser unas alteraciones que incluyen Ile para el aminoácido en la posición 257 e Ile para el aminoácido en la posición 311 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Ile para el aminoácido en la posición 257 e His para el aminoácido en la posición 434. Otra realización no limitante de esta alteración puede incluir Val para el aminoácido en la posición 376 e His para el aminoácido en la posición 434.
- 35 Además, en otra realización no limitante, se pueden seleccionar moléculas de unión a antígenos que comprendan una región Fc con la característica de tener una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro en lugar de la característica descrita anteriormente de tener una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido. En una realización preferida, se pueden seleccionar moléculas de unión a antígenos que comprendan una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro sea 40 μ M (KD) o más fuerte. En una realización
- 40 más preferida, se pueden seleccionar moléculas de unión a antígenos que comprendan una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro sea 15 μ M (KD) o más fuerte.
- Además, en otra realización no limitante, se pueden seleccionar moléculas de unión a antígenos que comprendan una región Fc con la característica de tener una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro además de la característica descrita anteriormente de tener una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido.

En una realización preferida, se pueden seleccionar moléculas de unión a antígenos que comprendan una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es 40 μ M (KD) o más. En una realización más preferida, se pueden seleccionar moléculas de unión a antígenos que comprendan una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro sea 15 μ M (KD) o más fuerte.

- 5 Las regiones Fc preferidas tienen una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido y/o en el intervalo de pH neutro. Cuando una región Fc tiene originalmente una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido y/o en el intervalo de pH neutro, esta se puede usar tal cual. Cuando una región Fc tiene una actividad de unión a FcRn humano débil o nula en el intervalo de pH ácido y/o intervalo de pH neutro, se pueden obtener moléculas de unión a antígenos que comprenden una región Fc que tiene una actividad de unión a FcRn humano deseada alterando
- 10 los aminoácidos de la región Fc comprendida en las moléculas de unión a antígenos. Las regiones Fc que tienen una actividad de unión a FcRn humano deseada en el intervalo de pH ácido y/o en el intervalo de pH neutro también se pueden obtener de forma adecuada alterando los aminoácidos de una región Fc humana. Como alternativa, se pueden obtener moléculas de unión a antígenos que comprenden una región Fc que tiene una actividad de unión a FcRn humano deseada alterando los aminoácidos de una región Fc que originalmente tenía una actividad de unión a FcRn
- 15 humano en el intervalo de pH ácido y/o en el intervalo de pH neutro. Se pueden descubrir las alteraciones de aminoácidos de una región Fc humana que dan como resultado dicha actividad de unión deseada comparando la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido y/o en el intervalo de pH neutro antes y después de la alteración de los aminoácidos. Los expertos en la técnica pueden alterar apropiadamente los aminoácidos usando métodos conocidos.
- 20 Como se usa en este documento, "alteración de aminoácidos" o "alteración de un aminoácido" de una región Fc incluye la alteración en una secuencia de aminoácidos que es diferente de la de la región Fc de partida. La región Fc de partida puede ser cualquier región Fc, siempre que una variante modificada de la región Fc de partida pueda unirse a FcRn humano en un intervalo de pH ácido (es decir, la región Fc de partida no necesita tener una actividad de unión a FcRn humano en un intervalo de pH neutro). Los ejemplos de regiones Fc de partida incluyen preferiblemente
- 25 regiones Fc de anticuerpos IgG, es decir, regiones de Fc nativas. Además, una región Fc alterada modificada a partir de una región Fc de partida que ya ha sido modificada también puede usarse preferiblemente como una región Fc alterada como se describe en este documento. La "región Fc de partida" puede referirse al polipéptido en sí mismo, a una composición que comprende la región Fc de partida o a una secuencia de aminoácidos que codifica la región Fc de partida. Las regiones Fc de partida pueden comprender una región Fc de anticuerpo IgG conocida producida mediante recombinación descrita brevemente en la sección "Anticuerpo". El origen de las regiones Fc de partida no está limitado y se pueden obtener de organismos humanos o no humanos. Dichos organismos incluyen preferiblemente ratones, ratas, cobayas, hámsteres, jerbos, gatos, conejos, perros, cabras, ovejas, bovinos, caballos, camellos y organismos seleccionados de primates no humanos. En otra realización, las regiones Fc de partida también se pueden obtener a partir de monos cynomolgus, titíes, monos rhesus, chimpancés o seres humanos. Las regiones
- 35 Fc de partida se pueden obtener preferiblemente a partir de IgG1 humana; sin embargo, no se limitan a ninguna subclase de IgG en particular. Esto significa que una región Fc representada por IgG1 (SEQ ID NO:9), IgG2 (SEQ ID NO:10), IgG3 (SEQ ID NO:11), o IgG4 (SEQ ID NO:12) humanas se puede usar apropiadamente como una región Fc de partida, y en el presente documento también significa que una región Fc de una clase o subclase de IgG arbitraria derivada de cualquier organismo descrito anteriormente puede usarse preferiblemente como región Fc de partida. En documentos publicados se describen ejemplos de variantes de IgG de origen natural o formas alteradas (Curr. Opin. Biotechnol. (2009), 20 (6): 685-91; Curr. Opin. Immunol. (2008), 20 (4), 460-470; Protein Eng. Des. Sel. (2010), 23 (4): 195-202; publicaciones internacionales n.ºs WO 2009/086320, WO 2008/092117, WO 2007/041635 y WO 2006/105338); sin embargo, no se limitan a los ejemplos.

- 45 Los ejemplos de alteraciones incluyen aquellas con una o más mutaciones, por ejemplo, mutaciones por sustitución de diferentes restos aminoácidos por aminoácidos de regiones Fc de partida, por inserción de uno o más restos aminoácidos en regiones Fc de partida, o por delección de uno o más aminoácidos de la región Fc de partida. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc alteradas comprenden al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de una región Fc no nativa. Tales variantes tienen necesariamente una identidad de secuencia o una similitud menor del 100 % con su región Fc de partida. En una realización preferida, las variantes
- 50 tienen una identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % a menos de 100 %, más preferiblemente de aproximadamente 80 % a menos de 100 %, incluso más preferiblemente de aproximadamente 85 % a menos de 100 %, aún más preferiblemente aproximadamente 90 % a menos del 100 %, y aún más preferiblemente alrededor del 95 % a menos del 100 % de la secuencia de aminoácidos de su región Fc de partida. En una realización no limitante, al menos un aminoácido es diferente entre una región Fc modificada como se describe en este documento
- 55 y su región Fc de partida. La diferencia de aminoácidos entre una región Fc modificada como se describe en el presente documento y su región Fc de partida también se puede especificar preferiblemente basándose en las diferencias de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos particulares descritas anteriormente según el sistema de numeración EU.

- 60 Se pueden emplear de manera apropiada métodos conocidos, tal como la mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82, 488-492)) y la PCR de extensión por solapamiento, para alterar los aminoácidos de las regiones Fc. Además, también se pueden utilizar varios métodos conocidos como método de alteración de aminoácidos para sustituir aminoácidos por otros distintos de los aminoácidos naturales (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006), 35, 225-249; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003), 100 (11), 6353-6357). Por ejemplo, se puede utilizar,

de modo adecuado, un sistema de traducción sin células (Clover Direct (Protein Express)) que contiene ARNt en el que el ARNt supresor ámbar, que es complementario con el codón UAG (codón ámbar) que es un codón de fin, está unido a un aminoácido no natural.

Las regiones Fc comprendidas en las moléculas de unión a antígenos como se describen en el presente documento que tienen una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido pueden obtenerse mediante cualquier método. Específicamente, se pueden seleccionar moléculas de unión a antígenos que comprenden una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido es 20 μ M (KD) o más fuerte; en una realización más favorable, una región Fc cuya actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido es 2,0 μ M (KD) o más fuerte; y en una realización aún más favorable, una región Fc cuya actividad de unión al FcRn humano en el intervalo de pH ácido es 0,5 μ M (KD) o más fuerte como resultado de la alteración de los aminoácidos de una inmunoglobulina humana de tipo IgG utilizada como región Fc de partida. Las regiones Fc preferidas de inmunoglobulinas de tipo IgG para su modificación incluyen, por ejemplo, las de IgG humanas tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 mostradas en las SEQ ID NO:9, 10, 11 y 12, respectivamente, y variantes de las mismas.

Cuando una molécula de unión a antígenos comprende la región Fc de IgG1 humana como la región Fc, los ejemplos adecuados de aminoácidos que se pueden alterar para lograr los efectos deseados mencionados anteriormente sobre la unión a FcRn en una condición de intervalo de pH ácido alterando los aminoácidos de un Inmunoglobulina humana de tipo IgG como región Fc de partida incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y 447 según a la numeración EU como se describe en el documento WO 2000/042072. De manera similar, los ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 385, 386, 387, 389., 428, 433, 434 y 436 de acuerdo con la numeración EU como se describe en el documento WO 2002/060919. Además, los aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen, por ejemplo, los aminoácidos de las posiciones 250, 314 y 428 según la numeración EU como se describe en el documento WO2004/092219. Además, los ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 251, 252, 307, 308, 378, 428, 430, 434 y 436 según la numeración EU como se describe en el documento WO 2010/045193. La alteración de estos aminoácidos potencia la unión a FcRn de la región Fc de una inmunoglobulina de tipo IgG en una condición de intervalo de pH ácido.

También se pueden obtener regiones Fc que tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro alterando los aminoácidos de la inmunoglobulina humana de tipo IgG utilizada como región Fc de partida. Las regiones Fc de inmunoglobulinas de tipo IgG adecuadas para la modificación incluyen, por ejemplo, las de IgG humanas tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente, representadas por SEQ ID NO:9, 10, 11 y 12, y formas modificadas de las mismas. Los aminoácidos de cualquier posición se pueden alterar por otros aminoácidos, siempre que las regiones Fc tengan la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro o puedan aumentar la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo neutro. Cuando la molécula de unión a antígenos contiene la región Fc de IgG1 humana como región Fc humana, es preferible que la región Fc resultante contenga una modificación que provoque el efecto de potenciar la unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro en comparación con la actividad de unión de la región Fc de la IgG1 humana de partida. Los aminoácidos que permiten dicha alteración incluyen, por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 221 a 225, 227, 228, 230, 232, 233 a 241, 243 a 252, 254 a 260, 262 a 272, 274, 276, 278 a 289, 291 a 312, 315 a 320, 324, 325, 327 a 339, 341, 343, 345, 360, 362, 370, 375 a 378, 380, 382, 385 a 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 a 438, 440 y 442 según la numeración EU. La alteración de estos aminoácidos mejora la unión a FcRn humano de la región Fc de la inmunoglobulina de tipo IgG en el intervalo de pH neutro.

De las descritas anteriormente, las alteraciones que mejoran la unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro se seleccionan apropiadamente para su uso en la presente descripción. Los aminoácidos particularmente preferidos de las regiones Fc modificadas incluyen, por ejemplo, los aminoácidos en las posiciones 237, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 y 436 según el sistema de numeración EU. La actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro de la región Fc contenida en una molécula de unión a antígenos puede aumentarse sustituyendo al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos anteriores por un aminoácido diferente.

Las alteraciones particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de:

Met para el aminoácido en la posición 237;

Ile para el aminoácido en la posición 248;

Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 250;

Phe, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 252;

Thr para el aminoácido en la posición 254;

- Glu para el aminoácido en la posición 255;
 Asp, Asn, Glu o Gln para el aminoácido en la posición 256;
 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 257;
 His para el aminoácido en la posición 258;
- 5 Ala para el aminoácido en la posición 265;
 Ala o Glu para el aminoácido en la posición 286;
 His para el aminoácido en la posición 289;
 Ala para el aminoácido en la posición 297;
 Ala para el aminoácido en la posición 303;
- 10 Ala para el aminoácido en la posición 305;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 307;
 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 308;
 Ala, Asp, Glu, Pro o Arg para el aminoácido en la posición 309;
 Ala, His o Ile para el aminoácido en la posición 311;
- 15 Ala o His para el aminoácido en la posición 312;
 Lys o Arg para el aminoácido en la posición 314;
 Ala, Asp o His para el aminoácido en la posición 315;
 Ala para el aminoácido en la posición 317;
 Val para el aminoácido en la posición 332;
- 20 Leu para el aminoácido en la posición 334;
 His para el aminoácido en la posición 360;
 Ala para el aminoácido en la posición 376;
 Ala para el aminoácido en la posición 380;
 Ala para el aminoácido en la posición 382;
- 25 Ala para el aminoácido en la posición 384;
 Asp o His para el aminoácido en la posición 385;
 Pro para el aminoácido en la posición 386;
 Glu para el aminoácido en la posición 387;
 Ala o Ser para el aminoácido en la posición 389;
- 30 Ala para el aminoácido en la posición 424;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 428;
 Lys para el aminoácido en la posición 433;
 Ala, Phe, His, Ser, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434; y
- 35 His, Ile, Leu, Phe, Thr o Val para el aminoácido en la posición 436 de la región Fc según la numeración EU. Por otra parte, el número de aminoácidos que se va a alterar no está en particular limitado y pueden alterarse un aminoácido en un solo sitio y pueden alterarse aminoácidos en dos o más sitios. Las combinaciones de estas alteraciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, las alteraciones de aminoácidos que se muestran en las tablas 5-1 a 5-32.

Tabla 5-1

Variante	KD (M)	Sitio de alteración de aminoácido
F1	8,10E-07	N434W
F2	3,20E-06	M252Y / S254T / T256E
F3	2,50E-06	N434Y
F4	5,80E-06	N434S
F5	6,80S-55	N434A
F7	5,60E-06	M252Y
F8	4,20E-06	M252W
F9	1,40E-07	M253Y / S254T / T256E / N434Y
F10	6,90E-08	M252Y / S254T / T256E / N434W
F11	3,0E-07	M252Y / N434Y
F12	1,70E-07	M252Y / N434W
F13	3,20E-07	M252W / N434Y
F14	1,80E-07	M252W / K434W
F19	4,60E-07	P257L / N434Y
F20	4,60E-07	V308F / N434Y
P21	3,00E-08	M252Y / Y308P / N434Y
F22	2,00E-06	M428L / N4434S
F25	9,20E-09	M252Y / S254T / T256E / V30SP / N434W
F26	1,00E-06	I332V
F27	7,40E-06	G237M
F29	1,40E-06	I332V / N434Y
F31	2,80E-06	G237M / V308F
F32	8,00E-07	S254T / M434W
F33	2.30E-06	S254T / N434Y
F34	2,80E-07	T256E / N434W
F35	8,40E-07	T256E / M434Y
F36	3,60E-07	S254T / T256E / N434W
F37	1,10E-06	S254T / T356E / N434Y
F38	1,00E-07	M252Y / S254T / N434W
P39	3,00E-07	M252Y / S254T / N434Y
F40	8,20E-08	M252Y / T256E / N434W
F41	1,50E-07	M252Y / T256E / N434Y

La tabla 5-2 es una tabla de continuación de la tabla 5-1.

Tabla 5-2

F42	1,00E-06	M252Y / S254T / T256E / N434A
F43	1,70E-06	M252Y / N434A
F44	1,10E-06	M252W / N434A
F47	2,40E-07	M252Y / T256Q / N434W

F48	3,20E-07	M252Y / T256Q / N434Y
F49	5,10E-07	M252F / T256D / N434W
F50	1,20E-06	M252F / T256D / N434Y
F51	8,10E-06	N434F / Y436H
F52	3,10E-06	H433K / N434F / Y436H
F53	1,00E-06	I332V / N434W
F54	8,40E-08	V308P / N434W
F56	9,40E-07	I332V / M428L / N434Y
F57	1,10E-05	G385D / Q386P / N389S
F58	7,70E-07	G385D / Q386P / N389S / N434W
F59	2,40E-06	G385D / Q386P / N389S / N434Y
F60	1,10E-05	G385H
F61	9,70E-07	G385H / N434W
F62	1,90E-06	G385H / N434Y
F63	2,50E-06	N434F
F64	5,30E-06	N434H
F65	2,90E-07	M252Y / S254T / T256E / N434F
F66	4,30E-07	M252Y / S254T / T256E / N434H
F67	6,30E-07	M252Y / N434F
F68	9,30E-07	M252Y / N434H
F69	5,10E-07	M428L / N434W
F70	1,50E-06	M428L / N434Y
F71	8,30E-08	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434W
F72	2,00E-07	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434Y
F73	1,70E-07	M252Y / M428L / N434W
F74	4,60E-07	M252Y / M428L / N434Y
F75	1,40E-06	M252Y / M428L / N434A
F76	1,00E-06	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434A
F77	9,90E-07	T256E / M428L / N434Y
F78	7,80E-07	S254T / M428L / N434W

La tabla 5-3 es una continuación de la tabla 5-2.

Tabla 5-3

F79	5,90E-06	S254T / T256E / N434A
F80	2,70E-06	M252Y / T256Q / N434A
F81	1,60E-06	M252Y / T256E / N434A
F82	1,10E-06	T256Q / N434W
F83	2,60E-06	T256Q / N434Y
F84	2,80E-07	M252W / T256Q / N434W
F85	5,50E-07	M252W / T256Q / N434Y
F86	1,50E-06	S254T / T256Q / N434W

F87	4,30E-06	S254T / T256Q / N434Y
F88	1,90E-07	M252Y / S254T / T256Q / N434W
F89	3,60E-07	M252Y / S254T / T256Q / N434Y
F90	1,90E-08	M252Y / T256E / V308P / N434W
F91	4,80E-08	M252Y / V308P / M428L / N434Y
F92	1,10E-08	M252Y / S254T / T256E / V308P / M428L / N434W
F93	7,40E-07	M252W / M428L / N434W
F94	3,70E-07	P257L / M428L / N434Y
F95	2,60E-07	M252Y / S254T / T256E / M428L / K434F
F99	6,20E-07	M252Y / T256E / N434H
F101	1,10E-07	M252W / T256Q / P257L / N434Y
F103	4,40E-08	P238A / M252Y / V308P / N434Y
F104	3,70E-08	M252Y / D265A / V308P / N434Y
F105	7,50E-08	M252Y / T307A / V308P / N434Y
F106	3,70E-08	M252Y / V303A / V308P / N434Y
F107	3,40E-08	M252Y / V308P / D376A / N434Y
F108	4,10E-08	M252Y / V305A / V308P / N434Y
F109	3,20E-08	M252Y / V308P / Q311A / N434Y
F111	3,20E-08	M252Y / V308P / K317A / N434Y
F112	6,40E-08	M252Y / V308P / E380A / N434Y
F113	3,20E-08	M252Y / V308P / E382A / N434Y
F114	3,80E-08	M252Y / V308P / S424A / N434Y
F115	6,60E-06	T307A / N434A
F116	8,70E-06	E380A / N434A
F118	1,40E-05	M428L
F119	5,40E-06	T250Q / M428L

La tabla 5-4 es una continuación de la tabla 5-3.

Tabla 5-4

F120	6,30E-08	P257L / V308P / M428L / N434Y
F121	1,50E-08	M252Y / T256E / V308P / M428L / N434W
F122	1,20E-07	M252Y / T256E / M428L / N434W
F123	3,00E-08	M252Y / T256E / V308P / N434Y
F124	2,90E-07	M252Y / T256E / M428L / N434Y
F125	2,40E-08	M252Y / S254T / T256E / V308P / M428L / N434Y
F128	1,70E-07	P257L / M428L / N434W
F129	2,20E-07	P257A / M428L / N434Y
F131	3,00E-06	P257G / M428L / N434Y
F132	2,10E-07	P257I / M428L / N434Y
F133	4,10E-07	P257M / M428L / N434Y
F134	2,70E-07	P257N / M428L / N434Y

F135	7,50E-07	P257S / M428L / N434Y
F136	3,80E-07	P257T / M428L / N434Y
F137	4,60E-07	P257V / M428L / N434Y
F139	1,50E-08	M252W / V308P / N434W
F140	3,60E-08	S239K / M252Y / V308P / N434Y
F141	3,50E-08	M252Y / S298G / V308P / N434Y
F142	3,70E-08	M252Y / D270F / V308P / N434Y
F143	2,00E-07	M252Y / V308A / N434Y
F145	5,30E-08	M252Y / V308F / N434Y
F147	2,40E-07	M252Y / V308I / N434Y
F149	1,90E-07	M252Y / V308L / N434Y
F150	2,00E-07	M252Y / V308M / N434Y
F152	2,70E-07	M252Y / V308Q / N434Y
F154	1,80E-07	M252Y / V308T / N434Y
F157	1,50E-07	P257A / V308P / M428L / N434Y
F158	5,90E-08	P257T / V308P / M428L / N434Y
F159	4,40E-08	P257V / V308P / M428L / N434Y
F160	8,50E-07	M252W / M428I / N434Y
F162	1,60E-07	M252W / M428Y / N434Y
F163	4,20E-07	M252W / M428F / N434Y
F164	3,70E-07	P238A / M252W / N434Y
F165	2,90E-07	M252W / D265A / N434Y

La tabla 5-5 es una continuación de la tabla 5-4.

Tabla 5-5

F166	1,50E-07	M252W / T307Q / N434Y
F167	2,90E-07	M252W / V303A / N434Y
F168	3,20E-07	M252W / D376A / N434Y
F169	2,90E-07	M252W / V305A / N434Y
F170	1,70E-07	M252W / Q311A / N434Y
F171	1,90E-07	M252W / D312A / N434Y
F172	2,20E-07	M252W / K317A / N434Y
F173	7,70E-07	M252W / E380A / N434Y
F174	3,40E-07	M252W / E382A / N434Y
F175	2,70E-07	M252W / S424A / N434Y
F176	2,90E-07	S239K / M252W / N434Y
F177	2,80E-07	M252W / S298G / N434Y
F178	2,70E-07	M252W / D270F / N434Y
F179	3,0E-07	M252W / N325G / N434Y
F182	6,60E-08	P257A / M428L / N434W
F183	2,20E-07	P257T / M428L / N434W

ES 2 856 272 T3

F184	2,70E-07	P257V / M428L / N434W
F185	2,60E-07	M252W / I332V / N434Y
F188	3,00E-06	P257I / Q311I
F189	1,90E-07	M252Y / T307A / N434Y
F190	1,10E-07	M252Y / T307Q / N434Y
F191	1,60E-07	P257L / T307A / M428L / N434Y
F192	1,10E-07	P257A / T307A / M428L / N434Y
F193	8,50E-08	P257T / T307A / M428L / N434Y
F194	1,20E-07	P257V / T307A / M428L / N434Y
F195	5,60E-08	P257L / T307Q / M428L / N434Y
F196	3,50E-08	P257A / T307Q / M428L / N434Y
F197	3,30E-08	P257T / T307Q / M428L / N434Y
F198	4,80E-08	P257V / T307Q / M428L / N434Y
F201	2,10E-07	M252Y / T307D / N434Y
F203	2,40E-07	M252Y / T307F / N434Y
F204	2,10E-07	M252Y / T307G / N434Y
F205	2,00E-07	M252Y / T307H / N434Y
F206	2,30E-07	M252Y / T307I / N434Y

La tabla 5-6 es una continuación de la tabla 5-5.

Tabla 5-6

F207	9,40E-07	M252Y / T307K / N434Y
F208	3,90E-07	M252Y / T307L / N434Y
F209	1,30E-07	M252Y / T307M / N434Y
F210	2,90E-07	M252Y / T307N / N434Y
F211	2,40E-07	M252Y / T307P / N434Y
F212	6,80E-07	M252Y / T307R / N434Y
F213	2,30E-07	M252Y / T307S / N434Y
F214	1,70E-07	M252Y / T307V / N434Y
F215	9,60E-08	M252Y / T307W / N434Y
F216	2,30E-07	M252Y / T307Y / N434Y
F217	2,30E-07	M252Y / K334L / N434Y
F218	2,60E-07	M252Y / G385H / N434Y
F219	2,50E-07	M252Y / T289H / N434Y
F220	2,50E-07	M252Y / Q311H / N434Y
F221	3,10E-07	M252Y / D312H / N434Y
F222	3,40E-07	M252Y / N315H / N434Y
F223	2,70E-07	M252Y / K360H / N434Y
F225	1,50E-06	M252Y / L314R / N434Y
F226	5,40E-07	M252Y / L314K / N434Y
F227	1,20E-07	M252Y / N286E / N434Y

ES 2 856 272 T3

F228	2,30E-07	M252Y / L309E / N434Y
F229	5,10E-07	M252Y / R255E / N434Y
F230	2,50E-07	M252Y / P387E / N434Y
F236	8,90E-07	K248I / M428L / N434Y
F237	2,30E-07	M252Y / M428A / N434Y
F238	7,40E-07	M252Y / M428D / N434Y
F240	7,20E-07	M252Y / M428F / N434Y
F241	1,50E-06	M252Y / M428G / N434Y
F242	8,50E-07	M252Y / M428H / N434Y
F243	1,80E-07	M252Y / M428I / N434Y
F244	1,30E-06	M252Y / M428K / N434Y
F245	4,70E-07	M252Y / M428N / N434Y
F246	1,10E-06	M252Y / M428P / N434Y
F247	4,40E-07	M252Y / M428Q / N434Y

La tabla 5-7 es una continuación de la tabla 5-6.

Tabla 5-7

F249	6,40E-07	M252Y / M428S / N434Y
F250	2,90E-07	M252Y / M428T / N434Y
F251	1,90E-07	M252Y / M428V / N434Y
F252	1,00E-06	M252Y / M428W / N434Y
F253	7,10E-07	M252Y / M428Y / N434Y
F254	7,50E-08	M252W / T307Q / M428Y / N434Y
F255	1,10E-07	M252W / Q311A / M428Y / N434Y
F256	5,40E-08	M252W / T307Q / Q311A / M428Y / N434Y
F257	5,00E-07	M252Y / T307A / M428Y / N434Y
F258	3,20E-07	M252Y / T307Q / M428Y / N434Y
F259	2,80E-07	M252Y / D270F / N434Y
F260	1,30E-07	M252Y / T307A / Q311A / N434Y
F261	8,40E-08	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F262	1,90E-07	M252Y / T307A / Q311II / N434Y
F263	1,10E-07	M252Y / T307Q / Q311H / N434Y
F264	2,80E-07	M252Y / E382A / N434Y
F265	6,80E-07	M252Y / E382A / M428Y / N434Y
F266	4,70E-07	M252Y / T307A / E382A / M428Y / N434Y
F267	3,20E-07	M252Y / T307Q / E382A / M428Y / N434Y
F268	6,30E-07	P238A / M252Y / M428F / N434Y
F269	5,20E-07	M252Y / V305A / M428F / N434Y
F270	6,60E-07	M252Y / N325G / M428F / N434Y
F271	6,90E-07	M252Y / D376A / M428F / N434Y
F272	6,80E-07	M252Y / E380A / M428F / N434Y

ES 2 856 272 T3

F273	6,50E-07	M252Y / E382A / M428F / N434Y
F274	7,60E-07	M252Y / E380A / E382A / M428F / N434Y
F275	4,20E-08	S239K / M252Y / V308P / E382A / N434Y
F276	4,10E-08	M252Y / D270F / V308P / E382A / N434Y
F277	1,30E-07	S239K / M252Y / V308P / M428Y / N434Y
F278	3,00E-08	M252Y / T307Q / V308P / E382A / N434Y
F279	6,10E-08	M252Y / V308P / Q311H / E382A / N434Y
F280	4,10E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / N434Y
F281	9,20E-08	M252Y / V308P / E382A / M428F / N434Y
F282	2,90E-08	M252Y / V308P / E382A / M428L / N434Y

La tabla 5-8 es una continuación de la tabla 5-7.

Tabla 5-8

F283	1,00E-07	M252Y / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F284	1,00E-07	M252Y / V308P / M428Y / N434Y
F285	9,90E-08	M252Y / V308P / M428F / N434Y
F286	1,20E-07	S239K / M252Y / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F287	1,00E-07	M252Y / V308P / E380A / E382A / M428F / N434Y
F288	1,90E-07	M252Y / T256E / E382A / N434Y
F289	4,80E-07	M252Y / T256E / M428Y / N434Y
F290	4,60E-07	M252Y / T256E / E382A / M428Y / N434Y
F292	2,30E-08	S239K / V1252Y / V308Y / E382A / M428I / N434Y
F293	5,30E-08	M252Y / V308P / E380A / E382A / M428I / N434Y
F294	1,10E-07	S239K / M252Y / V308P / M428F / N434Y
F295	6,80E-07	S239K / M252Y / E380A / E382A / M428F / N434Y
F296	4,90E-07	M252Y / Q311A / M428Y / N434Y
F297	5,10E-07	M252Y / D312A / M428Y / N434Y
F298	4,80E-07	M252Y / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F299	9,40E-08	S239K / M252Y / V308P / Q31 1 A / M428Y / N434Y
F300	8,30E-08	S239K / M252Y / V308P / D312A / M428Y / N434Y
F301	7,20E-08	S239K / M252Y / V308P / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F302	1,90E-07	M252Y / T256E / T307P / N434Y
F303	6,70E-07	M252Y / T307P / M428Y / N434Y
F304	1,60E-08	M252W / V308P / M428Y / N434Y
F305	2,70E-08	M252Y / T256E / V308P / E382A / N434Y
F306	3,60E-08	M252W / V308P / E382A / N434Y
F307	3,60E-08	S239K / M252W / V308P / E382A / N434Y
F308	1,90E-08	S239K / M252W / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F310	9,40E-08	S239K / M252W / V308P / E382A / M428I / N434Y
F311	2,80E-08	S239K / M252W / V308P / M428F / N434Y
F312	4,50E-07	S239K / M252W / E380A / E382A / M428F / N434Y

ES 2 856 272 T3

F313	6,50E-07	S239K / M252Y / T307P / M428Y / N434Y
F314	3,20E-07	M252Y / T256E / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F315	6,80E-07	S239K / M252Y / M428Y / N434Y
F316	7,00E-07	S239K / M252Y / D270F / M428Y / N434Y
F317	1,10E-07	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428Y / N434Y
F318	1,80E-08	S239K / M252Y / V308P / M428I / N434Y

La tabla 5-9 es una continuación de la tabla 5-8.

Tabla 5-9

F320	2,00E-08	S239K / M252Y / V308P / N325G / E382A / M428I / N434Y
F321	3,20E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / N434Y
F322	9,20E-08	S239K / M252Y / D270F / T307P / V308P / N434Y
F323	2,70E-08	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / N434Y
F324	2,80E-08	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / N434Y
F325	2,10E-08	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F326	7,50E-08	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / N434Y
F327	6,50E-08	S239K / M252Y / T256E / D270F / T307Q / Q311A / N434Y
F328	1,90E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428I / N434Y
F329	1,20E-08	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / N434Y
F330	3,60E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / N434Y
F331	3,00E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / P387E / N434Y
F333	7,40E-08	S239K / M252Y / D270F / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F334	1,90E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / M428I / N434Y
F335	1,50E-08	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / M428I / N434Y
F336	1,40E-08	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F337	5,60E-08	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F338	7,70E-09	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / M428I / N434Y
F339	1,90E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / M428I / N434Y
F343	3,20E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428L / N434Y
F344	3,00E-08	S239K / M252Y / V308P / M428L / N434Y
F349	1,50E-07	S239K / M252Y / V308P / L309P / M428L / N434Y
F350	1,70E-07	S239K / M252Y / V308P / L309R / M428L / N434Y
F352	6,00E-07	S239K / M252Y / L309P / M428L / N434Y
F353	1,10E-06	S239K / M252Y / L309R / M428L / N434Y
F354	2,80E-08	S239K / M252Y / T307Q / V308P / M428L / N434Y
F356	3,40E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / P387E / K434Y
F357	1,60E-08	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / N325G / M428I / N434Y
F358	1,00E-07	S239K / M252Y / T307Q / N434Y
F359	4,20E-07	P257V / T307Q / M428I / N434Y
F360	1,30E-06	P257V / T307Q / M428V / N434Y
F362	5,40E-08	P257V / T307Q / M325G / M428L / N434Y

ES 2 856 272 T3

F363	4,10E-08	P257V / T307Q / Q311A / M428L / N434Y
F364	3,50E-08	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428L / N434Y

La tabla 5-10 es una tabla de continuación de la tabla 5-9.

Tabla 5-10

F365	5,10E-08	P257V / V305A / T307Q / M428L / N434Y
F367	1,50E-08	S239K / M252Y / E258H / D270F / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F368	2,00E-08	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / E382A / M428I / N434Y
F369	7,50E-08	M252Y / P257V / T307Q / M428I / N434Y
F372	1,30E-08	S239K / M252W / V308P / M428Y / N434Y
F373	1,10E-08	S239K / M252W / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F374	1,20E-08	S239K / M252W / T256E / V308P / M428Y / N434Y
F375	5,50E-09	S239K / M252W / N286E / V308P / M428Y / N434Y
F376	9,60E-09	S289K / M252Y / T256E / D270F / N286E / V308P / N444Y
F377	1,30E-07	S239K / M252W / T307P / M428Y / N434Y
F379	9,00E-09	S239K / M252W / T256E / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F380	5,60E-09	S239K / M252W / T256E / N286E / V308P / M428Y / N434Y
F381	1,10E-07	P257V / T307A / Q311A / M428L / N434Y
F382	8,70E-08	P257V / V305A / T307A / M428L / N434Y
F386	3,20E-08	M252Y / V308P / L309E / N434Y
F387	1,50E-07	M252Y / V308P / L309D / N434Y
F388	7,00E-08	M252Y / V308P / L309A / N434Y
F389	1,70E-08	M252W / V308P / L309E / M428Y / N434Y
F390	6,80E-08	M252W / V308P / L309D / M428Y / N434Y
F391	3,60E-08	M252W / V308P / L309A / M428Y / N434Y
F392	6,90E-09	S239K / M252Y / N286E / V308P / M428I / N434Y
F393	1,20E-08	S239K / M252Y / N286E / V308P / N434Y
F394	5,30E-08	S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F395	2,40E-08	S239K / M252Y / T256E / V308P / N434Y
F396	2,00E-08	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F397	4,50E-08	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / P387E / M428I / N434Y
F398	4,40E-09	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F399	6,50E-09	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / V308P / M428I / N434Y
F400	6,10E-09	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F401	6,90E-09	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / P387E / M428I / N434Y
F402	2,30E-08	P257V / T307Q / M428L / N434W
F403	5,10E-08	P257V / T307A / M428L / N434W
F404	9,40E-08	P257A / T307Q / L309P / M428L / N434Y
F405	1,70E-07	P257V / T307Q / L309P / M428L / N434Y

5 La tabla 5-11 es una tabla de continuación de la tabla 5-10.

Tabla 5-11

F406	1,50E-07	P257A / T307Q / L309R / M428L / N434Y
F407	1,60E-07	P257V / T307Q / L309R / M428L / N434Y
F408	2,50E-07	P257V / N286E / M428L / N434Y
F409	2,00E-07	P257V / P387E / M428L / N434Y
F410	2,20E-07	P257V / T307H / M428L / N434Y
F411	1,30E-07	P257V / T307N / M428L / N434Y
F412	8,80E-08	P257V / T307G / M428L / N434Y
F413	1,20E-07	P257V / T307P / M428L / N434Y
F414	1,10E-07	P257V / T307S / M428L / N434Y
F415	5,60E-08	P257V / N286E / T307A / M428L / N434Y
F416	9,40E-08	P257V / T307A / P387E / M428L / N434Y
F418	6,20E-07	S239K / M252Y / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F419	1,60E-07	M252Y / T307A / Q311H / K360H / N434Y
F420	1,50E-07	M252Y / T307A / Q311H / P387E / N434Y
F421	1,30E-07	M252Y / T307A / Q311H / M428A / N434Y
F422	1,80E-07	M252Y / T307A / Q311H / E382A / N434Y
F423	8,40E-08	M252Y / T307W / Q311H / N434Y
F424	9,40E-08	S239K / P257A / V308P / M428L / N434Y
F425	8,00E-08	P257A / V308P / L309E / M428L / N434Y
F426	8,40E-08	P257V / T307Q / N434Y
F427	1,10E-07	M252Y / P257V / T307Q / M428V / N434Y
F428	8,00E-08	M252Y / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F429	3,70E-08	M252Y / P257V / T307Q / N434Y
F430	8,10E-08	M252Y / P257V / T307Q / M428Y / N434Y
F431	6,50E-08	M252Y / P257V / T307Q / M428F / N434Y
F432	9,20E-07	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428V / N434Y
F433	6,00E-08	P257V / T307Q / Q311A / N325G / N434Y
F434	2,00E-08	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428Y / N434Y
F435	2,50E-08	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428F / N434Y
F436	2,50E-07	P257A / T307Q / M428V / N434Y
F437	5,70E-08	P257A / T307Q / N434Y
F438	3,60E-08	P257A / T307Q / M428Y / N434Y
F439	4,00E-08	P257A / T307Q / M428F / N434Y
F440	1,50E-08	P257V / N286E / T307Q / Q311A / N325G / M428L / N434Y

La tabla 5-12 es una tabla de continuación de la tabla 5-11.

Tabla 5-12

F441	1,80E-07	P257A / Q311A / M428L / N434Y
F442	2,00E-07	P257A / Q311H / M428L / N434Y
F443	5,50E-08	P257A / T307Q / Q311A / M428L / N434Y

ES 2 856 272 T3

F444	1,40E-07	P257A / T307A / Q311A / M428L / N434Y
F445	6,20E-08	P257A / T307Q / Q311H / M428L / N434Y
F446	1,10E-07	P257A / T307A / Q311H / M428L / N434Y
F447	1,40E-08	P257A / N286E / T307Q / M428L / N434Y
F448	5,30E-08	P257A / N286E / T307A / M428L / N434Y
F449	5,70E-07	S239K / M252Y / D270F / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F450	5,20E-07	S239K / M252Y / T307P / L309E / N325G / M428Y / N434Y
F451	1,00E-07	P257S / T307A / M428L / N434Y
F452	1,40E-07	P257M / T307A / M428L / N434Y
F453	7,80E-08	P257N / T307A / M428L / N434Y
F454	9,60E-08	P257I / T307A / M428L / N434Y
F455	2,70E-08	P257V / T307Q / M428Y / N434Y
F456	3,40E-08	P257V / T307Q / M428F / N434Y
F457	4,00E-08	S239K / P257V / V308P / M428L / N434Y
F458	1,50E-08	P257V / T307Q / V308P / N325G / M428L / N434Y
F459	1,30E-08	P257V / T307Q / V308P / Q311A / N325G / M428L / N434Y
F460	4,70E-08	P257V / T307A / V308P / N325G / M428L / N434Y
F462	8,50E-08	P257A / V308P / N325G / M428L / N434Y
F463	1,30E-07	P257A / T307A / V308P / M428L / N434Y
F464	5,50E-08	P257A / T307Q / V308P / M428L / N434Y
F465	2,10E-08	P257V / N286E / T307Q / N325G / M428L / N434Y
F466	3,50E-07	T256E / P257V / N434Y
F467	5,70E-07	T256E / P257T / N434Y
F468	5,70E-08	S239K / P257T / V308P / M428L / N434Y
F4R9	S,60E-08	P257T / V308P / N325G / M428L / N434Y
F470	5,40E-08	T256E / P257T / V308P / N325G / M428L / N434Y
F471	6,60E-08	P257T / V308P / K325G / E382A / M428L / N434Y
F472	5,40E-08	P257T / V308P / K325G / P387E / M428L / N434Y
F473	4,50E-07	P257T / V308P / L309P / N325G / M428L / N434Y
F474	3,50E-07	P257T / V308P / L309R / N325G / M428L / N434Y
F475	4,30E-08	T256E / P257V / T307Q / M428L / N434Y

La tabla 5-13 es una tabla de continuación de la tabla 5-12.

Tabla 5-13

F476	5,50E-08	P257V / T307Q / E382A / M428L / N434Y
F477	4,30E-08	P257V / T307Q / P387E / M428L / N434Y
F480	3,90E-08	P257L / V308P / N434Y
F481	5,60E-08	P257T / T307Q / N434Y
F482	7,00E-08	P257V / T307Q / N325G / N434Y
F483	5,70E-08	P257V / T307Q / Q311A / N434Y
F484	6,20E-08	P257V / V305A / T307Q / N434Y

F485	9,70E-08	P257V / N286E / T307A / N434Y
F486	3,40E-07	P257V / T307Q / L309R / Q311H / M428L / N434Y
F488	3,50E-08	P257V / V308P / N325G / M428L / N434Y
F490	7,50E-08	S239K / P257V / V308P / Q311H / M428L / N434Y
F492	9,80E-08	P257V / V305A / T307A / N325G / M428L / N434Y
F493	4,90E-07	S239K / D270F / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F497	3,10E-06	P257T / T307A / M428V / N434Y
F498	1,30E-06	P257A / M428V / N434Y
F499	5,20E-07	P257A / T307A / M428V / N434Y
F500	4,30E-08	P257S / T307Q / M428L / N434Y
F506	1,90E-07	P257V / N297A / T307Q / M428L / N434Y
F507	5,10E-08	P257V / N286A / T307Q / M428L / N434Y
F508	1,10E-07	P257V / T307Q / N315A / M428L / N434Y
F509	5,80E-08	P257V / T307Q / N384A / M428L / N434Y
F510	5,30E-08	P257V / T307Q / N389A / M428L / N434Y
F511	4,20E-07	P257V / N434Y
F512	5,80E-07	P257T / N434Y
F517	3,10E-07	P257V / N286E / N434Y
F518	4,20E-07	P257T / N286E / N434Y
F519	2,60E-08	P257V / N286E / T307Q / N434Y
F521	1,10E-08	P257V / N286E / T307Q / M428Y / N434Y
F523	2,60E-08	P257V / V305A / T307Q / M428Y / N434Y
F526	1,90E-08	P257T / T307Q / M428Y / N434Y
F527	9,40E-09	P257V / T307Q / V308P / N325G / M428Y / N434Y
F529	2,50E-08	P257T / T307Q / M428F / N434Y
F533	1,20E-08	P257A / N286E / T307Q / M428F / N434Y
F534	1,20E-08	P257A / N286E / T307Q / M428Y / N434Y

La tabla 5-14 es una continuación de la tabla 5-13.

Tabla 5-14

F535	3,90E-08	T250A / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F538	9,90E-08	T250F / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F541	6,00E-08	T250I / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F544	3,10E-08	T250M / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F549	5,40E-08	T250S / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F550	5,90E-08	T250V / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F551	1,20E-07	T250W / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F552	1,10E-07	T250Y / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F553	1,70E-07	M252Y / Q311A / N434Y
F554	2,80E-08	S239K / M252Y / S254T / V308P / N434Y
F556	1,50E-06	M252Y / T307Q / Q311A

ES 2 856 272 T3

F559	8,00E-08	M252Y / S254T / N286E / N434Y
F560	2,80E-08	M252Y / S254T / V308P / N434Y
F561	1,40E-07	M252Y / S254T / T307A / N434Y
F562	8,30E-08	M252Y / S254T / T307Q / N434Y
F563	1,30E-07	M252Y / S254T / Q311A / N434Y
F564	1,90E-07	M252Y / S254T / Q311H / N434Y
F565	9,20E-08	M252Y / S254T / T307A / Q311A / N434Y
F566	6,10E-08	M252Y / S254T / T307Q / Q311A / N434Y
F567	2,20E-07	M252Y / S254T / M428I / N434Y
F568	1,10E-07	M252Y / T256E / T307A / Q311H / N434Y
F569	2,00E-07	M252Y / T256Q / T307A / Q311H / N434Y
F570	1,30E-07	M252Y / S254T / T307A / Q311H / N434Y
F571	8,10E-08	M252Y / N286E / T307A / Q311H / N434Y
F572	1,00E-07	M252Y / T307A / Q311H / M428I / N434Y
F576	1,60E-06	M252Y / T256E / T307Q / Q311H
F577	1,30E-06	M252Y / N286E / T307A / Q311A
F578	5,70E-07	M252Y / N286E / T307Q / Q311A
F580	8,60E-07	M252Y / N286E / T307Q / Q311H
F581	7,20E-08	M252Y / T256E / N286E / N434Y
F582	7,50E-07	S239K / M252Y / V308P
F583	7,80E-07	S239K / M252Y / V308P / E382A
F584	6,30E-07	S239K / M252Y / T256E / V308P
F585	2,90E-07	S239K / M252Y / N286E / V308P

La tabla 5-15 es una continuación de la tabla 5-14.

Tabla 5-15

F586	1,40E-07	S239K / M252Y / N286E / V308P / M428I
F587	1,90E-07	M252Y / N286E / M428L / N434Y
F592	2,00E-07	M252Y / S254T / E382A / N434Y
F593	3,10E-08	S239K / M252Y / S254T / V308P / M428I / N434Y
F594	1,60E-08	S239K / M252Y / T256E / V308P / M428I / N434Y
F595	1,80E-07	S239K / M252Y / M428I / N434Y
F596	4,00E-07	M252Y / D312A / E382A / M428Y / N434Y
F597	2,20E-07	M252Y / E382A / P387E / N434Y
F598	1,40E-07	M252Y / D312A / P387E / N434Y
F599	5,20E-07	M252Y / P387E / M428Y / N434Y
F600	2,80E-07	M252Y / T256Q / E382A / N434Y
F601	9,60E-09	M252Y / N286E / V308P / N434Y
F608		G236A / S239D / I332E
F611	2,80E-07	M252Y / V305T / T307P / V308I / L309A / N434Y
F612	3,60E-07	M252Y / T307P / V308I / L309A / N434Y

F613		S239D / A330L / I332E
F616		S239D / K326D / L328Y
F617	7,40E-07	S239K / N434W
F618	6,40E-07	S239K / V308F / N434Y
F619	3,10E-07	S239K / M252Y / N434Y
F620	2,10E-07	S239K / M252Y / S254T / N434Y
F621	1,50E-07	S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F622	3,50E-07	S239K / M252Y / T256Q / N434Y
F623	1,80E-07	S239K / M252W / N434W
F624	1,40E-08	S239K / P257A / N286E / T307Q / M428L / N434Y
F625	7,60E-08	S239K / P257A / T307Q / M428L / N434Y
F626	1,30E-06	V308P
F629	3,90E-08	M252Y / V279L / V308P / N434Y
F630	3,70E-08	S239K / M252Y / V279L / V308P / N434Y
F633	2,40E-08	M252Y / V282D / V308P / N434Y
F634	3,20E-08	S239K / M252Y / V282D / V308P / N434Y
F635	4,50E-08	M252Y / V284K / V308P / N434Y
F636	4,80E-08	S239K / M252Y / V284K / V308P / N434Y
F637	1,50E-07	M252Y / K288S / V308P / N434Y

La tabla 5-16 es una continuación de la tabla 5-15.

Tabla 5-16

F638	1,40E-07	S239K / M252Y / K288S / V308P / N434Y
F639	2,70E-08	M252Y / V308P / G385R / N434Y
F640	3,60E-08	S239K / M252Y / V308P / G385R / N434Y
F641	3,00E-08	M252Y / V308P / Q386K / N434Y
F642	3,00E-08	S239K / M252Y / V308P / Q386K / N434Y
F643	3,20E-08	L235G / G236R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F644	3,00E-08	G236R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F645	3,30E-08	S239K / M252Y / V308P / L328R / N434Y
F646	3,80E-08	S239K / M252Y / N297A / V308P / N434Y
F647	2,90E-08	P238D / M252Y / V308P / N434Y
F648		P238D
F649	1,20E-07	S239K / M252Y / N286E / N434Y
F650	1,70E-07	S239K / M252Y / T256E / N434Y
F651	1,80E-07	S239K / M252Y / Q311A / N434Y
F652	2,40E-07	P238D / M252Y / N434Y
F654	3,20E-08	L235K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F655	3,40E-08	L235R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F656	3,30E-08	G237K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F657	3,20E-08	G237R / S239K / M252Y / V308P / N434Y

F658	3,20E-08	P238K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F659	3,00E-08	P238R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F660	3,10E-08	S239K / M252Y / V308P / P329K / N434Y
F661	3,40E-08	S239K / M252Y / V308P / P329R / N434Y
F663	6,40E-09	S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F664	3,90E-08	M252Y / N286A / V308P / N434Y
F665	2,00E-08	M252Y / N286D / V308P / N434Y
F666	2,10E-08	M252Y / N286F / V308P / N434Y
F667	3,00E-08	M252Y / N286G / V308P / N434Y
F668	4,00E-08	M252Y / N286H / V308P / N434Y
F669	3,50E-08	M252Y / N286I / V308P / N434Y
F670	2,10E-07	M252Y / N286K / V308P / N434Y
F671	2,20E-08	M252Y / N286L / V308P / N434Y
F672	2,40E-08	M252Y / N286M / V308P / N434Y
F673	2,30E-08	M252Y / N286P / V308P / N434Y

La tabla 5-17 es una continuación de la tabla 5-16.

Tabla 5-17

F674	3,20E-08	M252Y / N286Q / V308P / N434Y
F675	5,10E-08	M252Y / N286R / V308P / N434Y
F676	3,20E-08	M252Y / N286S / V308P / N434Y
F677	4,70E-08	M252Y / N286T / V308P / N434Y
F678	3,30E-08	M252Y / N286V / V308P / N434Y
F679	1,70E-08	M252Y / N286W / V308P / N434Y
F680	1,50E-08	M252Y / N286Y / V308P / N434Y
F681	4,90E-08	M252Y / K288A / V308P / N434Y
F682	8,20E-08	M252Y / K288D / V308P / N434Y
F683	5,00E-08	M252Y / K288E / V308P / N434Y
F684	5,10E-08	M252Y / K288F / V308P / N434Y
F685	5,30E-08	M252Y / K288G / V308P / N434Y
F686	4,60E-08	M252Y / K288H / V308P / N434Y
F687	4,90E-08	M252Y / K288I / V308P / N434Y
F688	2,80E-08	M252Y / K288L / V308P / N434Y
F689	4,10E-08	M252Y / K288M / V308P / N434Y
F690	1,00E-07	M252Y / K288N / V308P / N434Y
F691	3,20E-07	M252Y / K288P / V308P / N434Y
F692	3,90E-08	M252Y / K288Q / V308P / N434Y
F693	3,60E-08	M252Y / K288R / V308P / N434Y
F694	4,70E-08	M252Y / K288V / V308P / N434Y
F695	4,00E-08	M252Y / K288W / V308P / N434Y
F696	4,40E-08	M252Y / K288Y / V308P / N434Y

F697	3,10E-08	S239K / M252Y / V308P / N325G / N434Y
F698	2,20E-08	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F699	2,30E-08	S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F700	5,20E-08	M252Y / V308P / L328E / N434Y
F705	7,10E-09	M252Y / N286E / V308P / M428I / N434Y
F706	1,80E-08	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F707	5,90E-09	M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F708	4,10E-09	M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F709	2,00E-08	S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F710	1,50E-08	P238D / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F711	6,50E-08	S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y

La tabla 5-18 es una continuación de la tabla 5-17.

Tabla 5-18

F712	6,00E-08	P238D / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F713	2,00E-08	P238D / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F714	2,30E-07	P238D / M252Y / N325S / N434Y
F715	2,30E-07	P238D / M252Y / N325M / N434Y
F716	2,70E-07	P238D / M252Y / N325L / N434Y
F717	2,60E-07	P238D / M252Y / N325I / N434Y
F718	2,80E-07	P238D / M252Y / Q295M / N434Y
F719	7,40E-08	P238D / M252Y / N325G / N434Y
F720	2,40E-08	M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F721	1,50E-08	M252Y / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F722	2,70E-07	P238D / M252Y / A327G / N434Y
F723	2,80E-07	P238D / M252Y / L328D / N434Y
F724	2,50E-07	P238D / M252Y / L328E / N434Y
F725	4,20E-08	L235K / G237R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F726	3,70E-08	L235K / P238K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F729	9,20E-07	T307A / Q311A / N434Y
F730	6,00E-07	T307Q / Q311A / N434Y
F731	8,50E-07	T307A / Q311H / N434Y
F732	6,80E-07	T307Q / Q311H / N434Y
F733	3,20E-07	M252Y / L328E / N434Y
F734	3,10E-07	G236D / M252Y / L328E / N434Y
F736	3,10E-07	M252Y / S267M / L328E / N434Y
F737	3,10E-07	M252Y / S267L / L328E / N434Y
F738	3,50E-07	P238D / M252Y / T307P / N434Y
F739	2,20E-07	M252Y / T307P / Q311A / N434Y
F740	2,90E-07	M252Y / T307P / Q311H / N434Y
F741	3,10E-07	P238D / T250A / M252Y / N434Y

F744	9,90E-07	P238D / T250F / M252Y / N434Y
F745	6,60E-07	P238D / T250G / M252Y / N434Y
F746	6,00E-07	P238D / T250H / M252Y / N434Y
F747	2,80E-07	P238D / T250I / M252Y / N434Y
F749	5,10E-07	P238D / T250L / M252Y / N434Y
F750	3,00E-07	P238D / T250M / M252Y / N434Y
F751	5,30E-07	P238D / T250N / M252Y / N434Y

La tabla 5-19 es una tabla de continuación de la tabla 5-18.

Tabla 5-19

F753	1,80E-07	P238D / T250Q / M252Y / N434Y
F755	3,50E-07	P238D / T250S / M252Y / N434Y
F756	3,70E-07	P238D / T250V / M252Y / N434Y
F757	1,20E-06	P238D / T250W / M252Y / N434Y
F758	1,40E-06	P238D / T250Y / M252Y / N434Y
F759		L235K / S239K
F760		L235R / S239K
F761	1,10E-06	P238D / N434Y
F762	3,60E-08	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F763	3,50E-08	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F764	6,30E-07	P238D / T307Q / Q311A / N434Y
F765	8,50E-08	P238D / M252Y / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F766	6,00E-07	T307A / L309E / Q311A / N434Y
F767	4,30E-07	T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F768	6,40E-07	T307A / L309E / Q311H / N434Y
F769	4,60E-07	T307Q / L309E / Q311H / N434Y
F770	3,00E-07	M252Y / T256A / N434Y
F771	4,00E-07	M252Y / E272A / N434Y
F772	3,80E-07	M252Y / K274A / N434Y
F773	3,90E-07	M252Y / V282A / N434Y
F774	4,00E-07	M252Y / N286A / N434Y
F775	6,20E-07	M252Y / K338A / N434Y
F776	3,90E-07	M252Y / K340A / N434Y
F777	3,90E-07	M252Y / E345A / N434Y
F779	3,90E-07	M252Y / N361A / N434Y
F780	3,90E-07	M252Y / Q362A / N434Y
F781	3,70E-07	M252Y / S375A / N434Y
F782	3,50E-07	M252Y / Y391A / N434Y
F783	4,00E-07	M252Y / D413A / N434Y
F784	5,00E-07	M252Y / L309A / N434Y
F785	7,40E-07	M252Y / L309H / N434Y

ES 2 856 272 T3

F786	2,80E-08	M252Y / S254T / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F787	8,80E-08	M252Y / S254T / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F788	4,10E-07	M252Y / N315A / N434Y

La tabla 5-20 es una tabla de continuación de la tabla 5-19.

Tabla 5-20

F789	1,50E-07	M252Y / N315D / N434Y
F790	2,70E-07	M252Y / N315E / N434Y
F791	4,40E-07	M252Y / N315F / N434Y
F792	4,40E-07	M252Y / N315G / N434Y
F793	3,30E-07	M252Y / N315I / N434Y
F794	4,10E-07	M252Y / N315K / N434Y
F795	3,10E-07	M252Y / N315L / N434Y
F796	3,40E-07	M252Y / N315M / N434Y
F798	3,50E-07	M252Y / N315Q / N434Y
F799	4,10E-07	M252Y / N315R / N434Y
F800	3,80E-07	M252Y / N315S / N434Y
F801	4,40E-07	M252Y / N315T / N434Y
F802	3,30E-07	M252Y / N315V / N434Y
F803	3,60E-07	M252Y / N315W / N434Y
F804	4,00E-07	M252Y / N315Y / N434Y
F805	3,00E-07	M252Y / N325A / N434Y
F806	3,10E-07	M252Y / N384A / N434Y
F807	3,20E-07	M252Y / N389A / N434Y
F808	3,20E-07	M252Y / N389A / N390A / N434Y
F809	2,20E-07	M252Y / S254T / T256S / N434Y
F810	2,20E-07	M252Y / A378V / N434Y
F811	4,90E-07	M252Y / E380S / N434Y
F812	2,70E-07	M252Y / E382V / N434Y
F813	2,80E-07	M252Y / S424E / N434Y
F814	1,20E-07	M252Y / N434Y / Y436I
F815	5,50E-07	M252Y / N434Y / T437R
F816	3,60E-07	P238D / T250V / M252Y / T307P / N434Y
F817	9,80E-08	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F819	1,40E-07	P238D / M252Y / N286E / N434Y
F820	3,40E-07	L235K / S239K / M252Y / N434Y
F821	3,10E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y
F822	1,10E-06	P238D / T250Y / M252Y / W313Y / N434Y
F823	1,10E-06	P238D / T250Y / M252Y / W313F / N434Y
F828	2,50E-06	P238D / T250V / M252Y / I253V / N434Y

ES 2 856 272 T3

La tabla 5-21 es una tabla de continuación de la tabla 5-20.

Tabla 5-21

F831	1,60E-06	P238D / T250V / M252Y / R255A / N434Y
F832	2,60E-06	P238D / T250V / M252Y / R255D / N434Y
F833	8,00E-07	P238D / T250V / M252Y / R255E / N434Y
F834	8,10E-07	P238D / T250V / M252Y / R255F / N434Y
F836	5,00E-07	P238D / T250V / M252Y / R255H / N434Y
F837	5,60E-07	P238D / T250V / M252Y / R255I / N434Y
F838	4,30E-07	P238D / T250V / M252Y / R255K / N434Y
F839	3,40E-07	P238D / T250V / M252Y / R255L / N434Y
F840	4,20E-07	P238D / T250V / M252Y / R255M / N434Y
F841	1,10E-06	P238D / T250V / M252Y / R255N / N434Y
F843	6,60E-07	P238D / T250V / M252Y / R255Q / N434Y
F844	1,30E-06	P238D / T250V / M252Y / R255S / N434Y
F847	3,40E-07	P238D / T250V / M252Y / R255W / N434Y
F848	8,30E-07	P238D / T250V / M252Y / R255Y / N434Y
F849	3,30E-07	M252Y / D280A / N434Y
F850	2,90E-07	M252Y / D280E / N434Y
F852	3,30E-07	M252Y / D280G / N434Y
F853	3,20E-07	M252Y / D280H / N434Y
F855	3,20E-07	M252Y / D280K / N434Y
F858	3,20E-07	M252Y / D280N / N434Y
F860	3,30E-07	M252Y / D280Q / N434Y
F861	3,20E-07	M252Y / D280R / N434Y
F862	3,00E-07	M252Y / D280S / N434Y
F863	2,70E-07	M252Y / D280T / N434Y
F867	2,80E-07	M252Y / N384A / N389A / N434Y
F868	2,00E-08	G236A / S239D / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F869		G236A / S239D
F870	7,30E-08	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F871	7,10E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F872	1,30E-07	L235K / S239K / M252Y / N286E / N434Y
F873	1,20E-07	L235R / S239K / M252Y / N286E / N434Y
F875	4,80E-07	M252Y / N434Y / Y436A
F877	8,30E-07	M252Y / N434Y / Y436E
F878	1,90E-07	M252Y / N434Y / Y436F

La tabla 5-22 es una tabla de continuación de la tabla 5-21.

5 Tabla 5-22

F879	9,20E-07	M252Y / N434Y / Y436G
F880	3,90E-07	M252Y / N434Y / Y436H

F881	3,10E-07	M252Y / N434Y / Y436K
F882	1,30E-07	M252Y / N434Y / Y436L
F883	2,10E-07	M252Y / N434Y / Y436M
F884	4,00E-07	M252Y / N434Y / Y436N
F888	4,80E-07	M252Y / N434Y / Y436S
F889	2,20E-07	M252Y / N434Y / Y436T
F890	1,10E-07	M252Y / N434Y / Y436V
F891	1,70E-07	M252Y / N434Y / Y436W
F892	7,10E-08	M252Y / S254T / N434Y / Y436I
F893	9,80E-08	L235K / S239K / M252Y / N434Y / Y436I
F894	9,20E-08	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436I
F895	2,10E-08	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N315E / N434Y
F896	2,00E-08	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N315E / N434Y
F897	9,70E-08	M252Y / N315D / N384A / N389A / N434Y
F898	1,70E-07	M252Y / N315E / N384A / N389A / N434Y
F899	1,10E-07	M252Y / N315D / G316A / N434Y
F900	1,70E-07	M252Y / N315D / G316D / N434Y
F901	1,30E-07	M252Y / N315D / G316E / N434Y
F902	2,20E-07	M252Y / N315D / G316F / N434Y
F903	2,30E-07	M252Y / N315D / G316H / N434Y
F904	1,00E-07	M252Y / N315D / G316I / N434Y
F905	1,30E-07	M252Y / N315D / G316K / N434Y
F906	1,50E-07	M252Y / N315D / G316L / N434Y
F907	1,30E-07	M252Y / N315D / G316M / N434Y
F908	1,50E-07	M252Y / N315D / G316N / N434Y
F909	1,30E-07	M252Y / N315D / G316P / N434Y
F910	1,40E-07	M252Y / N315D / G316Q / N434Y
F911	1,30E-07	M252Y / N315D / G316R / N434Y
F912	1,20E-07	M252Y / N315D / G316S / N434Y
F913	1,10E-07	M252Y / N315D / G316T / N434Y
F914	1,50E-07	M252Y / N315D / G316V / N434Y
F915	2,30E-07	M252Y / N315D / G316W / N434Y

La tabla 5-23 es una tabla de continuación de la tabla 5-22.

Tabla 5-23

F917	2,50E-07	M252Y / N286S / N434Y
F918	2,80E-07	M252Y / D280E / N384A / N389A / N434Y
F919	3,30E-07	M252Y / D280G / N384A / N389A / N434Y
F920	2,50E-07	M252Y / N286S / N384A / N389A / N434Y
F921	1,20E-07	M252Y / N286E / N384A / N389A / N434Y
F922	5,90E-08	L235K / S239K / M252Y / N286E / N434Y / Y436I

ES 2 856 272 T3

F923	6,00E-08	L235R / S239K / M252Y / N286E / N434Y / Y436I
F924	3,40E-08	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F925	3,20E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F926	1,10E-07	L235K / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436I
F927	1,00E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436I
F928	2,90E-08	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F929	2,90E-08	M252Y / S254T / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F930	1,40E-07	P238D / T250V / M252Y / N286E / N434Y
F931	1,20E-07	P238D / T250V / M252Y / N434Y / Y436I
F932	3,20E-07	T250V / M252Y / N434Y
F933	3,00E-07	L234R / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F934	3,10E-07	G236K / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F935	3,20E-07	G237K / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F936	3,20E-07	G237R / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F937	3,10E-07	P238D / S239K / T250V / M252Y / N434Y
F938	1,60E-07	L235K / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F939	1,50E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F940	1,50E-07	P238D / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F941	1,20E-08	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F942	4,20E-08	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F943	4,00E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F944	1,70E-07	T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F945	1,70E-08	T250V / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F946	4,30E-08	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F947	1, 10E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F954	5,30E-07	M252Y / N434Y / H435K / Y436V
F957	7,70E-07	M252Y / N434Y / H435N / Y436V
F960	8,00E-07	M252Y / N434Y / H435R / Y436V

La tabla 5-24 es una tabla de continuación de la tabla 5-23.

Tabla 5-24

F966	3,10E-07	M252Y / S254A / N434Y
F970	2,50E-06	M252Y / S254G / N434Y
F971	2,60E-06	M252Y / S254H / N434Y
F972	2,60E-07	M252Y / S254I / N434Y
F978	1,30E-06	M252Y / S254Q / N434Y
F980	1,80E-07	M252Y / S254V / N434Y
F987	4,00E-08	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F988	6,90E-08	P238D / T250V / M252Y / N286E / N434Y / Y436V
F989	1,40E-08	L235R / S239K / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F990	9,40E-09	L235R / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V

ES 2 856 272 T3

F991	1,30E-08	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F992	5,10E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F993	3,80E-08	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F994	2,80E-07	M252Y / N325G / N434Y
F995	2,90E-07	L235R / P238D / S239K / M252Y / N434Y
F996	1,30E-07	L235R / P238D / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F997	3,80E-07	K248I / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F998	8,50E-07	K248Y / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F999	2,10E-07	T250V / M252Y / E258H / N434Y / Y436V
F1005		N325G
F1008	1,70E-07	L235R / S239K / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F1009	1,20E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1010	1,90E-07	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F1011	4,50E-08	T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1012	4,70E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1013	3,00E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1014	3,20E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1015	2,20E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1016	3,80E-09	T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1017	4,20E-09	L235R / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436 V
F1018	3,20E-09	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1019	3,40E-07	P238D / T250V / M252Y / N325G / N434Y
F1020	8,50E-08	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N325G / N434Y

La tabla 5-25 es una tabla de continuación de la tabla 5-24.

Tabla 5-25

F1021	3,30E-07	P238D / T250V / M252Y / N325A / N434Y
F1022		K326D / L328Y
F1023	4,40E-08	S239D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1024	4,00E-08	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
F1025	3,60E-08	S239D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
F1026	8,40E-08	M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1027	8,60E-08	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1028	4,60E-08	G236A / S239D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1029	5,10E-08	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / I332E / N434Y / Y436V
F1030		I332E
F1031	5,30E-08	G236A / S239D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / I332E / N434Y / Y436V
F1032	4,30E-08	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N325G / N434Y / Y436V
F1033	1,00E-06	P238D / N434W
F1034	1,50E-08	L235K / S239K / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F1035	1,00E-08	L235K / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V

ES 2 856 272 T3

F1036	1,40E-08	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1037	6,10E-08	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1038	2,80E-07	L235K / P238D / S239K / M252Y / N434Y
F1039	1,30E-07	L235K / P238D / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1040	2,00E-07	L235K / S239K / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F1041	1,40E-08	L235K / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1042	2,00E-07	L235K / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F1043	5,20E-08	L235K / S239K / T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1044	3,50E-08	L235K / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1045	2,50E-08	L235K / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1046	4,50E-09	L235K / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436 V
F1047	3,40E-09	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1048	9,90E-08	L235K / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1050	3,50E-09	T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1051	3,90E-09	L235R / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434 Y / Y436V
F1052	3,20E-09	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436 V

La tabla 5-26 es una tabla de continuación de la tabla 5-25.

Tabla 5-26

F1053	4,23E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1058	1,31E-07	M252Y / Q386E / N434Y / Y436V
F1059	1,39E-07	M252Y / Q386R / N434Y / Y436V
F1060	1,43E-07	M252Y / Q386S / N434Y / Y436V
F1061	1,19E-07	M252Y / P387E / N434Y / Y436V
F1062	1,2E-07	M252Y / P387R / N434Y / Y436V
F1063	1,43E-07	M252Y / P387S / N434Y / Y436V
F1064	1,32E-07	M252Y / V422E / N434Y / Y436V
F1065	1,38E-07	M252Y / V422R / N434Y / Y436V
F1066	1,45E-07	M252Y / V422S / N434Y / Y436V
F1067	1,26E-07	M252Y / S424E / N434Y / Y436V
F1068	1,69E-07	M252Y / S424R / N434Y / Y436V
F1069	1,39E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438E
F1070	1,73E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R
F1071	1,24E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438S
F1072	1,35E-07	M252Y / N434Y / Y436V / S440E
F1073	1,34E-07	M252Y / N434Y / Y436V / S440R
F1074	1,32E-07	S239D / M252Y / N434Y / Y436V
F1075	1,4E07	M252Y / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
F1076	1,27E-07	S239D / M252Y / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
F1077	2,03E-06	K248N / M252Y / N434Y
F1078	4,7E-07	M252Y / E380N / E382S / N434Y

F1079	3,44E-07	M252Y / E382N / N384S / N434Y
F1080	3,19E-07	M252Y / S424N / N434Y
F1081	6,2E-07	M252Y / N434Y / Y436N / Q438T
F1082	2,76E-07	M252Y / N434Y / Q438N
F1083	3,45E-07	M252Y / N434Y / S440N
F1094	2,6E-07	M252Y / N434Y / S442N
F1095	2,86E-07	M252Y / S383N / G385S / N434Y
F1096	2,72E-07	M252Y / Q386T / N434Y
F1097	2,82E-07	M252Y / G385N / P387S / N434Y
F1098	2,58E-07	S239D / M252Y / N434Y
F1099	2,57E-07	M252Y / K326D / L328Y / N434Y
F1100	2,41E-07	S239D / M252Y / K326D / L328Y / N434Y
F1101	6,59E-08	S239D / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F1102	6,46E-08	M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y
F1103	6,11E-08	S239D / M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y
F1104	1,77E-07	M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1105	1,54E-07	M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V
F1106	1,42E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1107	1,23E-07	M252Y / V422D / N434Y / Y436V

La tabla 5-27 es una tabla de continuación de la tabla 5-26.

Tabla 5-27

F1108	1,26E-07	M252Y / V422K / N434Y / Y436V
F1109	1,27E-07	M252Y / V422T / N434Y / Y436V
F1110	1,33E-07	M252Y / V422Q / N434Y / Y436V
F1111	1,65E-07	M252Y / S424K / N434Y / Y436V
F1112	1,23E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K
F1113	1,18E-07	M252Y / N434Y / Y436V / S440D
F1114	1,31E-07	M252Y / N434Y / Y436V / S440Q
F1115	1,35E-07	M252Y / S424N / N434Y / Y436V
F1116	7,44E-08	M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y
P1117	4,87E-08	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1118	1,32E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1119	1,03E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / V422E / N434Y / Y436V
F1120	1,04E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424R / N434Y / Y436V
F1121	1,04E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1122	1,37E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R
F1123	9,55E-09	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / S440E
F1124	1,22E-08	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1125	5,18E-08	M252Y / T307Q / N434Y / Y436V
F1126	8,95E-08	M252Y / T307A / N434Y / Y436V

F1127	7,94E-08	M252Y / Q311A / N434Y / Y436V
F1128	1,17E-07	M252Y / Q311H / N434Y / Y436V
F1129	4,48E-08	M252Y / T307Q / Q311H / N434Y / Y436V
F1130	5,54E-08	M252Y / T307A / Q311A / N434Y / Y436V
F1131	1,29E-07	L235R / S239K / M252Y / V422E / N434Y / Y436V
F1132	1,4E-07	L235R / S239K / M252Y / V422S / N434Y / Y436V
F1133	1,58E-07	L235R / S239K / M252Y / S424R / N434Y / Y436V
F1134	1,66E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R
F1135	1,26E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / S440E
F1136	1,63E-07	L235R / S239K / M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1137	1,58E-07	L235R / S239K / M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V
F1138	1,65E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1139	1,52E-07	L235R / S239K / M252Y / S424N / N434Y / Y436V
F1140	1,62E-07	M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1141	1,77E-07	M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1142	1,87E-07	L235R / S239K / M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1143	1,98E-07	L235R / S239K / M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1144	1,44E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S 440E
F1145	5,23E-08	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1146	6,24E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1147	7,19E-08	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Q438R / S440E

La tabla 5-28 es una continuación de la tabla 5-27.

Tabla 5-28

F1148	7,63E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Q438R / S440E
F1151	2,51E-07	L235R / S239K / M252Y / S424N / N434Y
F1152	7,38E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y
F1153	4,85E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1154	1,34E-08	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1157	2,09E-07	M252Y / N434Y / Q438R / S440E
F1158	2,44E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Q438R / S440E
F1159	4,79E-07	S424N / N434W
F1160	2,88E-07	V308F / S424N / N434Y
F1161	1,07E-06	I332V / S424N / N434Y
F1162	3,43E-07	P238D / T250Y / M252Y / N434Y / Y436V
F1163	1,54E-07	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F1164	6,96E-08	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1165	1,63E-08	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1174	4,9E-07	P257I / N434H
F1176	1,98E-06	V308F
F1178	8,72E-07	V259I / V308F / M428L

ES 2 856 272 T3

F1183	1,28E-06	E380A / M428L / N434S
F1184	1E-06	T307A / M428L / N434S
F1185	9,17E-07	T307A / E380A / M428L / N434S
F1188	1,72E-06	T307A / E380A / N434H
F1189	1,57E-07	M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1190	2,4E-07	M252Y / H433E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1191	2,11E-07	M252Y / N434Y / Y436V / T437A / Q438R / S440E
F1192	1,27E-07	M252Y / N434Y / Y436V / T437G / Q438R / S440E
F1194	1,55E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / K439D / S440E
F1195	1,76E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E / L441A
F1196	1,51E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E / L441E
F1197	9,46E-08	M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1198	7,83E-08	M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1199	6,25E-08	M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1200	1,26E-07	T250V / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1201	1,07E-07	T250V / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1202	8,81E-08	T250V / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1203	1,52E-07	M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1204	1,18E-07	M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1205	1,98E-07	T250V / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1206	1,69E-07	T250V / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1207	1,11E-06	I332E / M428L / N434S
F1208	5,71E-07	L251A / M252Y / N434Y / Y436V
F1211	1,23E-06	L251H / M252Y / N434Y / Y436V

La tabla 5-29 es una continuación de la tabla 5-28.

Tabla 5-29

F1213	6,33E-07	L251N / M252Y / N434Y / Y436V
F1216	1,16E-06	L251S / M252Y / N434Y / Y436V
F1217	1,14E-06	L251T / M252Y / N434Y / Y436V
F1218	2,51E-07	L251V / M252Y / N434Y / Y436V
F1229	2,81E-06	M252Y / I253V / N434Y / Y436V
F1230	1,12E-07	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1231	9,73E-08	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1232	9,79E-08	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1243	1,25E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1244	1,02E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1245	8,2E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1246	1,73E-07	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1247	1,45E-07	L235R / S239K / T250V / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1248	1,2E-07	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

ES 2 856 272 T3

F1249	2,06E-07	L235R / S239K / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1250	1,66E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1251	2,77E-07	L235R / S239K / T250V / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1252	2,33E-07	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1253	1,12E-07	L235R / S239K / M252Y / T307A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1254	6,42E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1255	1,11E-07	L235R / S239K / M252Y / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1256	1,56E-07	L235R / S239K / M252Y / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1257	7,81E-08	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1258	1,05E-07	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1259	4,46E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1260	6,53E-08	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1261	1,35E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1262	1,26E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1263	1,24E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1264	1,27E-07	L235R / S239K / M252Y / T256A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1265	1,57E-07	L235R / S239K / M252Y / T256G / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1266	9,99E-08	L235R / S239K / M252Y / T256N / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1267	1,5E-07	L235R / S239K / M252Y / S254A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1268	2E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1269	1,69E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1270	1,18E-07	L235R / S239K / M252Y / S254A / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1271	2,05E-07	L235R / S239K / M252Y / S254A / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1272	1,71E-07	L235R / S239K / M252Y / S254A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1273	1,53E-07	L235R / S239K / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1274	2,48E-07	L235R / S239K / M252Y / T256Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1275	2,09E-07	L235R / S239K / M252Y / T256Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D

La tabla 5-30 es una continuación de la tabla 5-29.

Tabla 5-30

F1276	1,02E-07	L235R / S239K / M252Y / T256A / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1277	1,69E-07	L235R / S239K / M252Y / T256A / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1278	1,4E-07	L235R / S239K / M252Y / T256A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1279	1,23E-07	L235R / S239K / M252Y / T256G / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1280	2,09E-07	L235R / S239K / M252Y / T256G / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1281	1,74E-07	L235R / S239K / M252Y / T256G / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1282	7,69E-08	L235R / S239K / M252Y / T256N / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1283	1,34E-07	L235R / S239K / M252Y / T256N / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1284	1,12E-07	L235R / S239K / M252Y / T256N / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1285	9,36E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1286	1,57E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

ES 2 856 272 T3

F1287	1,5E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1288	7,95E-08	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1289	1,33E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1290	1,11E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1291	1,51E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V
F1292	4,24E-07	L235R / S239K / H433D / N434W / Y436V / Q438R / S440E
F1293	1,61E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Q438R / S440E
F1294	2E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1295	9,84E-08	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1296	2,27E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Q438R / S440E
F1297	2,5E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1298	1,47E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1299	1,5E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Q438K / S440D
F1300	1,63E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440D
F1301	8,3E-08	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440D
F1302	2,15E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Q438K / S440D
F1303	2,1E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440D
F1304	1,24E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440D
F1305	2,05E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1306	1,92E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1307	1,44E-07	L235R / S239K / M252Y / V422A / S424A / N434Y / Y436V
F1308	2,06E-07	L235R / S239K / M252Y / V422L / S424L / N434Y / Y436V
F1309	1,26E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438A / S440A
F1310	2,28E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438L / S440L
F1311	1,69E-07	L235R / S239K / M252Y / V422A / S424A / H433D / N434Y / Y436V
F1312	1,79E-07	L235R / S239K / M252Y / V422L / S424L / H433D / N434Y / Y436V
F1313	1,77E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438A / S440A
F1314	2,27E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438L / S440L
F1315	1,52E-07	G237K / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1316	1,49E-07	G237R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V

La tabla 5-31 es una continuación de la tabla 5-30.

Tabla 5-31

F1317	1,38E-07	S239K / M252Y / P329K / N434Y / Y436V
F1318	1,43E-07	S239K / M252Y / P329R / N434Y / Y436V
F1319	2,67E-07	M252Y / L328Y / N434Y
F1320	1,22E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1321	1,03E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1322	1,6E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1323	1,49E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1324	1,32E-07	L234A / L235A / M252Y / N434Y / Y436V

ES 2 856 272 T3

F1325	2,13E-07	L234A / L235A / M252Y / N297A / N434Y / Y436V
F1326	1,09E-08	L234A / L235A / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1327	1,41E-08	L234A / L235A / T250V / M252Y / N297A / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1328	1,52E-07	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1329	1,29E-07	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1330	1,03E-07	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1331	7,75E-08	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1333	1,23E-07	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1334	1,04E-07	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1335	8,78E-08	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1336	7,18E-08	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1337	7,41E-08	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1338	1,04E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1339	2,51E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1340	5,58E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1341	3,22E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1342	2,51E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1343	2,01E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1344	3,96E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1345	1,05E-07	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1346	8,59E-08	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1347	7,14E-08	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1348	5,52E-08	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1349	3,36E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1350	1,18E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1351	1,62E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1352	3,93E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1353	4,33E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1354	2,29E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1355	2,47E-07	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1356	1,58E-07	G236R / M252Y / L328R / N434Y / Y436V
F1357	2,81E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1358	9,07E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436F / Q438K / S440E

La tabla 5-32 es una continuación de la tabla 5-31.

Tabla 5-32

F1359	1,28E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1360	3,12E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1361	3,52E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1362	1,41E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1363	1,9E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E

F1364	7,49E-08	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1365	3,14E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1366	1,17E-07	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1367	1,79E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1368	5,49E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1369	7,6E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1370	9,14E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1371	1,09E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1372	2,28E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1373	8,67E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1374	1,2E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1375	1,03E-07	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V
F1376	9,09E-08	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V
F1377	8,27E-08	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V
F1378	3,61E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T
F1379	2,85E-07	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F

Receptor Fcγ

El receptor Fcγ (también descrito como FcγR) se refiere a un receptor capaz de unirse a la región Fc de anticuerpos monoclonales IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, e incluye todos los miembros que pertenecen a la familia de proteínas codificadas sustancialmente por un gen del receptor Fcγ. En humanos, la familia incluye FcγRI (CD64) que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32) que incluye las isoformas FcγRIIa (incluidos los alotipos H131 y R131, es decir, FcγRIIa (H) y FcγRIIa (R)), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (incluidos los alotipos V158 y F158, es decir, FcγRIIIa (V) y FcγRIIIa (F)) y FcγRIIIb (incluidos los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2); así como todos los FcγR humanos, isoformas de FcγR y alotipos de los mismos no identificados. Sin embargo, el receptor Fcγ no se limita a estos ejemplos. Sin limitarse a ello, FcγR incluye los derivados de seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. El FcγR puede derivarse de cualquier organismo. El FcγR de ratón incluye, sin limitarse a FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (FcγRIV, CD16-2), así como todos los FcγR de ratón, isoformas de FcγR y alotipos de los mismos no identificados. Dichos receptores Fcγ preferidos incluyen, por ejemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16) y/o FcγRIIIb (CD16) humanos. La secuencia del polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRI se muestran en las SEQ ID NO:15 (NM_000566.3) y 16 (NP_000557.1), respectivamente; la secuencia del polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIa (alotipo H131) se muestran en SEQ ID NO:17 (BC020823.1) y 18 (AAH20823.1) (el alotipo R131 es una secuencia en la que el aminoácido en la posición 166 de SEQ ID NO:18 se sustituye por Arg), respectivamente; la secuencia del polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIb se muestran en las SEQ ID NO:19 (BC146678.1) y 20 (AAI46679.1), respectivamente; la secuencia del polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIIa se muestran en las SEQ ID NO:21 (BC033678.1) y 22 (AAH33678.1), respectivamente; y la secuencia del polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIIb se muestran en las SEQ ID NO:23 (BC128562.1) y 24 (AAI28563.1), respectivamente (el número de acceso de RefSeq se muestra en cada uno de los paréntesis). Por ejemplo, lo que se describe como FcγRIIIaV cuando se usa el alotipo V158, a menos que se especifique lo contrario, se usa el alotipo F158; sin embargo, el alotipo de la isoforma FcγRIIIa descrito en el presente documento no debe interpretarse como en particular limitado.

En FcγRI (CD64), que incluye FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc, y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), la cadena α que se une a la porción Fc de la IgG está asociada con una cadena γ y común que tiene ITAM responsables de la transducción de la señal de activación intracelular. Por otra parte, el dominio citoplasmático de FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131) y FcγRIIc, contiene ITAM. Estos receptores se expresan en muchas células inmunitarias, como macrófagos, mastocitos y células presentadoras de antígenos. La señal de activación transducida tras la unión de estos receptores a la porción Fc de la IgG da como resultado el aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos, la producción de citoquinas inflamatorias, la desgranulación de los mastocitos y el aumento de la función de las células presentadoras de antígenos. Los receptores Fcγ que tienen la capacidad de transducir la señal de activación como se describe anteriormente también se denominan receptores Fcγ activadores.

Por otra parte, el dominio citoplásmico de FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) contiene ITIM responsables de la transducción de señales inhibitorias. El entrecruzamiento entre FcγRIIb y el receptor de células B (BCR) en las células B suprime la señal de activación de las BCR, lo que da como resultado la supresión de la producción de anticuerpos por medio de BCR. El entrecruzamiento de FcγRIII y FcγRIIb en macrófagos suprime la actividad fagocítica y la producción de citoquinas inflamatorias. Los receptores Fcγ que tienen la capacidad de transducir la señal inhibitoria como se describe anteriormente también se denominan receptores Fcγ inhibitorios.

Actividad de unión a FcγR de la región Fc

Como se mencionó anteriormente, las regiones Fc que tienen una actividad de unión al receptor Fcγ son ejemplos de regiones Fc comprendidas en las moléculas de unión a antígenos como se describe en el presente documento. Una realización no limitante de dicha región Fc incluye la región Fc de IgG1 (SEQ ID NO:9), IgG2 (SEQ ID NO:10), IgG3 (SEQ ID NO:11) o IgG4 (SEQ ID NO:12) humanas. Se puede evaluar si un receptor Fcγ tiene actividad de unión a la región Fc de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 mediante la selección ALPHA ("Amplified Luminiscent Proximity Homogeneous Assay", ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada), el método BIACORE basado en resonancia de plasmón de superficie ("surface resonance plasmon", SPR) y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006), 103 (11), 4005-4010), además de los formatos FACS y ELISA descritos anteriormente.

La selección ALPHA se realiza mediante la tecnología ALPHA basada en el principio descrito a continuación utilizando dos tipos de esferas: esferas donantes y aceptoras. Se detecta una señal luminiscente solo cuando las moléculas unidas a las esferas donantes interactúan biológicamente con moléculas unidas a las esferas aceptoras y cuando las dos esferas se encuentran muy próximas. Estimulado por el rayo láser, el fotosensibilizador en una esfera donante convierte el oxígeno alrededor de la esfera en oxígeno singulete excitado. Cuando el oxígeno singulete se difunde alrededor de las esferas donantes y alcanza las esferas aceptoras ubicadas muy cerca, se induce una reacción quimioluminiscente dentro de las esferas aceptoras. Esta reacción finalmente da como resultado una emisión de luz. Si las moléculas unidas a las esferas donantes no interactúan con las moléculas unidas a las esferas aceptoras, el oxígeno singulete producido por las esferas donantes no llega a las esferas aceptoras y no se produce la reacción quimioluminiscente.

Por ejemplo, una molécula de unión a antígenos marcada con biotina que comprende la región Fc se inmoviliza sobre las esferas donantes y el receptor Fcγ marcado con glutatión S-transferasa (GST) se inmoviliza sobre las esferas aceptoras. En ausencia de una molécula de unión a antígenos que comprenda una variante de la región Fc competitiva, el receptor Fcγ gamma interactúa con un complejo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje, induciendo, como resultado, una señal de 520 a 620 nm. La molécula de unión a antígenos que tiene una variante de la región Fc no marcada compite con la molécula de unión a antígenos que comprende una región Fc nativa por la interacción con el receptor Fcγ. La afinidad de unión relativa se puede determinar cuantificando la reducción de la fluorescencia como resultado de la competencia. Se conocen métodos para biotilar las moléculas de unión a antígenos, tales como anticuerpos que usan sulfo-NHS-biotina o similares. Los métodos apropiados para añadir el marcador GST a un receptor Fcγ incluyen métodos que implican condensar polipéptidos que codifican Fcγ y GST en marco, expresar el gen condensado usando células a las que se les introduce un vector al que el gen está operativamente unido y luego purificar usando una columna de glutatión. La señal inducida se puede analizar preferiblemente, por ejemplo, ajustándose a un modelo de competencia de un sitio basado en un análisis de regresión no lineal usando un software tal como GRAPHPAD PRISM (GraphPad; San Diego).

Una de las sustancias para observar su interacción está inmovilizada como ligando sobre la fina capa de oro de un chip detector. Cuando se dirige una luz sobre la superficie trasera del chip detector de modo que se produce una reflexión total en la interfase entre la capa fina de oro y el vidrio, la intensidad de la luz reflejada se reduce parcialmente en un determinado sitio (señal SPR). La otra sustancia para observar su interacción se inyecta como analito sobre la superficie del chip detector. La masa de molécula de ligando inmovilizada aumenta cuando el analito se une al ligando. Esto altera el índice de refracción del disolvente sobre la superficie del chip detector. El cambio en el índice de refracción provoca un cambio posicional de la señal SPR (a la inversa, la disociación desplaza la señal de nuevo a la posición original). En el sistema Biacore, la cantidad de desplazamiento descrito anteriormente (es decir, el cambio de masa sobre la superficie del chip detector) se representa gráficamente en el eje vertical y, por lo tanto, el cambio de masa a lo largo del tiempo se muestra como datos medidos (sensograma). Los parámetros cinéticos (constante de velocidad de asociación (ka) y constante de velocidad de disociación (kd)) se determinan a partir de la curva del sensograma, y la afinidad (KD) se determina a partir de la proporción entre estas dos constantes. En los métodos BIACORE se usa preferiblemente un ensayo de inhibición. Los ejemplos de dicho ensayo de inhibición se describen en Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006), 103 (11), 4005-4010.

Además de la región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:9), IgG2 (SEQ ID NO:10), IgG3 (SEQ ID NO:11) o IgG4 (SEQ ID NO:12), puede usarse de manera apropiada una región Fc con la unión a FcγR modificada que tenga una mayor actividad de unión al receptor Fcγ que una región Fc de una IgG humana nativa, como una región Fc como se describe en este documento. En este documento, "región Fc de una IgG humana nativa" se refiere a una región Fc en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) de la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas mostradas en SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12 es una cadena de azúcar que contiene fucosa. Tales regiones Fc con unión a FcγR modificada pueden producirse alterando los aminoácidos de la región Fc de una IgG humana nativa. Se puede determinar de manera apropiada si la actividad de unión a FcγR de una región Fc con unión a FcγR modificada es

mayor que la de una región Fc de una IgG humana nativa usando métodos descritos en la sección "Actividad de unión" mencionada anteriormente.

Como se usa en este documento, "alteración de aminoácidos" o "alteración de un aminoácido" de una región Fc incluye la alteración en una secuencia de aminoácidos que es diferente de la de la región Fc de partida. La región Fc de partida puede ser cualquier región Fc, siempre que una variante modificada de la región Fc de partida pueda unirse al receptor Fc γ humano en un intervalo de pH neutro. Además, una región Fc modificada a partir de una región Fc de partida que ya había sido modificada también puede usarse preferiblemente como una región Fc como se describe en el presente documento. La "región Fc de partida" puede referirse al polipéptido en sí mismo, a una composición que comprende la región Fc de partida o a una secuencia de aminoácidos que codifica la región Fc de partida. Las regiones Fc de partida pueden comprender regiones Fc conocidas producidas a través de recombinación descrita brevemente en la sección "Anticuerpo". El origen de las regiones Fc de partida no está limitado y se pueden obtener de organismos humanos o no humanos. Dichos organismos incluyen preferiblemente ratones, ratas, cobayas, hámsteres, jerbos, gatos, conejos, perros, cabras, ovejas, bovinos, caballos, camellos y organismos seleccionados de primates no humanos. En otra realización, las regiones Fc de partida también se pueden obtener a partir de monos cynomolgus, titíes, monos rhesus, chimpancés o seres humanos. Las regiones Fc de partida se pueden obtener preferiblemente a partir de IgG1 humana; sin embargo, no se limitan a ninguna clase de IgG en particular. Esto significa que una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas se puede usar apropiadamente como región Fc de partida, y en la presente también significa que una región Fc de una clase o subclase de IgG arbitraria derivada de cualquier organismo descrito anteriormente puede ser preferiblemente utilizada como región Fc de partida. Los ejemplos de variantes de IgG de origen natural o formas modificadas se describen en documentos publicados (Curr. Opin. Biotechnol. (2009), 20 (6): 685-691; Curr. Opin. Immunol. (2008), 20 (4), 460-470; Protein Eng. Des. Sel. (2010), 23 (4): 195-202; Publicaciones internacionales n.^{os} WO 2009/086320, WO 2008/092117, WO 2007/041635y WO 2006/105338); sin embargo, no se limitan a los ejemplos.

Los ejemplos de alteraciones incluyen aquellas con una o más mutaciones, por ejemplo, mutaciones por sustitución de diferentes restos aminoácidos por aminoácidos de regiones Fc de partida, por inserción de uno o más restos aminoácidos en regiones Fc de partida, o por delección de uno o más aminoácidos de la región Fc de partida. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc alteradas comprenden al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de una región Fc no nativa. Tales variantes tienen necesariamente una identidad de secuencia o una similitud menor del 100 % con su región Fc de partida. En una realización preferida, las variantes tienen una identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % a menos de 100 %, más preferiblemente de aproximadamente 80 % a menos de 100 %, incluso más preferiblemente de aproximadamente 85 % a menos de 100 %, aún más preferiblemente aproximadamente 90 % a menos del 100 %, y aún más preferiblemente alrededor del 95 % a menos del 100 % de la secuencia de aminoácidos de su región Fc de partida. En una realización no limitante, al menos un aminoácido es diferente entre una región Fc con unión a Fc γ R modificada como se describe en el presente documento y su región Fc de partida. La diferencia de aminoácidos entre una región Fc con unión a Fc γ R modificada como se describe en este documento y su región Fc de partida también se puede especificar preferiblemente en base a las diferencias de aminoácidos específicas en las posiciones de aminoácidos específicas descritas anteriormente según el sistema de numeración EU.

Se puede emplear de manera apropiada métodos conocidos, como la mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82, 488-492)) y la PCR de extensión por solapamiento, para alterar los aminoácidos de las regiones Fc. Además, también se pueden utilizar varios métodos conocidos como método de alteración de aminoácidos para sustituir aminoácidos por otros distintos de los aminoácidos naturales (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006), 35, 225-249; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003), 100 (11), 6353-6357). Por ejemplo, puede usarse de modo adecuado un sistema de traducción sin células (Clover Direct (Protein Express)) que contiene ARNt en el que el ARNt supresor ámbar, que es complementario con el codón UAG (codón ámbar) que es un codón de fin, se une con un aminoácido no natural.

Incluida en las moléculas de unión a antígenos descritas en el presente documento, puede obtenerse una región Fc con unión a Fc γ R modificada que tenga una actividad de unión al receptor Fc γ más alta que la de una región Fc de una IgG humana nativa (una región Fc con unión a Fc γ R modificada) por cualquier método. Específicamente, la región Fc con unión a Fc γ R modificada puede obtenerse alterando los aminoácidos de una inmunoglobulina humana de tipo IgG usada como región Fc de partida. Las regiones Fc preferidas de las inmunoglobulinas de tipo IgG para la alteración incluyen, por ejemplo, las de las IgG humanas mostradas en SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12 (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, respectivamente, y variantes de las mismas) .

Los aminoácidos de cualquier posición se pueden alterar para introducir otros aminoácidos, siempre que la actividad de unión hacia el receptor Fc γ sea mayor que la de la región Fc de una IgG humana nativa. Cuando la molécula de unión a antígenos contiene una región Fc de IgG1 humana como región Fc humana, preferiblemente contiene una alteración que produce el efecto de una actividad de unión al receptor Fc γ más alta que la de la región Fc de una IgG humana nativa, en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa. Tales alteraciones de aminoácidos se han indicado, por ejemplo, en publicaciones internacionales como WO2007/024249, WO2007/021841, WO2006/031370, WO2000/042072, WO2004/029207, WO2004/099249, WO2006/105338, WO2007/041635, WO2008/092117, WO2005/070963, WO2006/020114, WO2006/116260 y WO2006/023403.

- Los ejemplos de tales aminoácidos que pueden ser alterados incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en las posiciones 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 250, 251, 254, 255, 256, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 311, 313, 315, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 376, 377, 378, 379, 380, 382, 385, 392, 396, 421, 427, 428, 429, 434, 436 y 440 (UE numeración). Puede obtenerse una región Fc (región Fc con unión a FcγR modificada) que tenga una actividad de unión al receptor Fcγ más alta que la de una región Fc de una IgG humana nativa alterando estos aminoácidos.
- 5 Los ejemplos de alteraciones en particular preferibles para su uso en la presente invención incluyen al menos una o más alteraciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:
- Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 221;
- Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 222;
- Phe, Trp, Glu o Lys para el aminoácido en la posición 223;
- 15 Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 224;
- Glu, Lys o Trp para el aminoácido en la posición 225;
- Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 227;
- Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 228;
- Ala, Glu, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 230;
- 20 Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 231;
- Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 232;
- Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 233;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 234;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 235;
- 25 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 236;
- Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 237;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 238;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 239;
- Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 240;
- 30 Asp, Glu, Leu, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 241;
- Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 243;
- His para el aminoácido en la posición 244;
- Ala para el aminoácido en la posición 245;
- Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 246;
- 35 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 247;
- Glu, His, Gln o Tyr para el aminoácido en la posición 249;
- Glu o Gln para el aminoácido en la posición 250;
- Phe para el aminoácido en la posición 251;
- Phe, Met o Tyr para el aminoácido en la posición 254;
- 40 Glu, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 255;
- Ala, Met o Pro para el aminoácido en la posición 256;

- Asp, Glu, His, Ser o Tyr para el aminoácido en la posición 258;
- Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 260;
- Ala, Glu, Phe, Ile o Thr para el aminoácido en la posición 262;
- Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 263;
- 5 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 264;
- Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 265;
- Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 266;
- Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 267;
- Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 268;
- 10 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 269;
- Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 270;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 271;
- Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 272;
- Phe o Ile para el aminoácido en la posición 273;
- 15 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 274;
- Leu o Trp para el aminoácido en la posición 275;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 276;
- Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 278;
- Ala para el aminoácido en la posición 279;
- 20 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 280;
- Asp, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 281;
- Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 282;
- Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg o Tyr para el aminoácido en la posición 283;
- Asp, Glu, Leu, Asn, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 284;
- 25 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 285;
- Glu, Gly, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 286;
- Asn, Asp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 288;
- Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 290;
- Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 291;
- 30 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 292;
- Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 293;
- Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 294;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 295;
- Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 296;
- 35 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 297;
- Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 298;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 299;

- Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 300;
 Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 301;
 Ile para el aminoácido en la posición 302;
 Asp, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 303;
- 5 Asp, His, Leu, Asn o Thr para el aminoácido en la posición 304;
 Glu, Ile, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 305;
 Ala, Asp, Asn, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 311;
 Phe para el aminoácido en la posición 313;
 Leu para el aminoácido en la posición 315;
- 10 Glu o Gln para el aminoácido en la posición 317;
 His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 318;
 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 320;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 322;
 Ile para el aminoácido en la posición 323;
- 15 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 324;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 325;
 Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 326;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 327;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 328;
- 20 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 329;
 Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 330;
 Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 331;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 332;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 333;
- 25 Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 334;
 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 335;
 Glu, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 336;
 Glu, His o Asn para el aminoácido en la posición 337;
 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 339;
- 30 Ala o Val para el aminoácido en la posición 376;
 Gly o Lys para el aminoácido en la posición 377;
 Asp para el aminoácido en la posición 378;
 Asn para el aminoácido en la posición 379;
 Ala, Asn o Ser para el aminoácido en la posición 380;
- 35 Ala o Ile para el aminoácido en la posición 382;
 Glu para el aminoácido en la posición 385;
 Thr para el aminoácido en la posición 392;

Leu para el aminoácido en la posición 396;

Lys para el aminoácido en la posición 421;

Asn para el aminoácido en la posición 427;

Phe o Leu para el aminoácido en la posición 428;

5 Met para el aminoácido en la posición 429;

Trp para el aminoácido en la posición 434;

Ile para el aminoácido en la posición 436; y

Gly, His, Ile, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 440;

10 como lo indica la numeración EU. El número de aminoácidos que se van a alterar no está en particular limitado; y un aminoácido se puede alterar en un solo sitio o los aminoácidos se pueden alterar en dos o más sitios. Los ejemplos de combinaciones para alteraciones de aminoácidos en dos o más sitios incluyen los descritas en la tabla 6 (tablas 6-1 a 6-3).

Tabla 6-1

Combinación de aminoácidos	Combinación de aminoácidos
K370E / P396L / D270E	S239Q / I332Q
Q419H / P396L / D270E	S267D / I332E
V240A / P396L / D270E	S267E / I332E
R255L / P396L / D270E	S267L / A327S
R255L / P396L / D270E	S267Q / A327S
R255L / P396L / D270E / R292G	S298A / I332E
R255L / P396L / D270E	S304T / I332E
R255L / P396L / D270E / Y300L	S324G / I332D
F343L / D270E / K392N / P396L	S324G / I332E
F243L / R255L / D270E / P396L	S324I / I332D
F243L / R292P / Y300L / V305I / P396L	S324I / I332E
F243L / R292P / Y300L / P396L	T260H / I332E
F243L / R292P / Y300L	T335D / I332E
F243L / R292P / P396L	V240I / V266I
F243L / R292P / V305I	V264I / I332E
F243L / R292P	D265F / N297E / I332E
S298A / E333A / K334A	D265Y / N297D / I332E
E380A / T307A	F243L / V262I / V264W
K326M / E333S	N297D / A330Y / I332E
K326A / E333A	N297D / T299E / I332E
S317A / K353A	N297D / T299F / I332E
A327D / I332E	N297D / T299H / I332E
A330L / I332E	N297D / T299I / I332E
A330Y / I332E	N297D / T299L / I332E
E258H / I332E	N297D / T299V / I332E
E272H / I332E	P230A / E233D / I332E
E272I / N276D	P244H / P245A / P247V

Combinación de aminoácidos	Combinación de aminoácidos
E272R / I332E	S239D / A330L / I332E
E283H / I332E	S239D / A330Y / I332E
E293R / I332E	S239D / H268E / A330Y
F241L / V262I	S239D / I332E / A327A
F241W / F243W	S239D / I332E / A330I

La tabla 6-2 es una continuación de la tabla 6-1.

Tabla 6-2

F243L / V264I	S239D / N297D / I332E
H268D / A330Y	S239D / S298A / I332E
H268E / A330Y	S239D / V264I / I332E
K246H / I332E	S239E / N297D / I332E
L234D / I332E	S239E / V264I / I332E
L234E / I332E	S239N / A330L / I332E
L234G / I332E	S239N / A330Y / I332E
L234I / I332E	S239N / S298A / I332E
L234I / L235D	S239Q / V264I / I332E
L234Y / I332E	V264E / N297D / I332E
L235D / I332E	V264I / A330L / I332E
L235E / I332E	V264I / A330Y / I332E
L235I / I332E	V264I / S298A / I332E
L235S / I332E	Y296D / N297D / I332E
L328A / I332D	Y296E / N297D / I332E
L328D / I332D	Y296H / N297D / I332E
L328D / I332E	Y296N / N297D / I332E
L328E / I332D	Y296Q / N297D / I332E
L328E / I332E	Y296T / N297D / I332E
L328F / I332D	D265Y / N297D / T299L / I332E
L328F / I332E	F241E / F243Q / V262T / V264E
L328H / I332E	F241E / F243R / V262E / V264R
L328I / I332D	F241E / F243Y / V262T / V264R
L328I / I332E	F241L / F243L / V262I / V264I
L328M / I332D	F241R / F243Q / V262T / V264R
L328M / I332E	F241S / F243H / V262T / V264T
L328N / I332D	F241W / F243W / V262A / V264A
L328N / I332E	F241Y / F243Y / V262T / V264T
L328Q / I332D	I332E / A330Y / H268E / A327A
L328Q / I332E	N297D / I332E / S239D / A330L
L328T / I332D	N297D / S298A / A330Y / I332E
L328T / I332E	S239D / A330Y / I332E / K326E

L328V / I332D	S239D / A330Y / I332E / K326T
L328V / I332E	S239D / A330Y / I332E / L234I
L328Y / I332D	S239D / A330Y / I332E / L235D

La tabla 6-3 es una continuación de la tabla 6-2.

Tabla 6-3

L328Y / I332E	S239D / A330Y / I332E / V240I
N297D / I332E	S239D / A330Y / I332E / V264T
N297E / I332E	S239D / A330Y / I332E / V266I
N297S / I332E	S239D / D265F / N297D / I332E
P227G / I332E	S239D / D265H / N297D / I332E
P230A / E233D	S239D / D265I / N297D / I332E
Q295E / I332E	S239D / D265L / N297D / I332E
R255Y / I332E	S239D / D265T / N297D / I332E
S239D / I332D	S239D / D265V / N297D / I332E
S239D / I332E	S239D / D265Y / N297D / I332E
S239D / I332N	S239D / I332E / A330Y / A327A
S239D / I332Q	S239D / I332E / H268E / A327A
S239E / D265G	S239D / I332E / H268E / A330Y
S239E / D265N	S239D / N297D / I332E / A330Y
S239E / D265Q	S239D / N297D / I332E / K326E
S239E / I332D	S239D / N297D / I332E / L235D
S239E / I332E	S239D / V264I / A330L / I332E
S239E / I332N	S239D / V264I / S298A / I332E
S239E / I332Q	S239E / V264I / A330Y / I332E
S239N / I332D	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E
S239N / I332E	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E
S239N / I332N	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E
S239N / I332Q	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E
S239Q / I332D	S239D / I332E / H268E / A330Y / A327A
S239Q / I332E	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
S239Q / I332N	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E
S267E / L328F	G236D / S267E
S239D / S267E	

- 5 Para que las condiciones de pH midan la actividad de unión de la región Fc contenida en la molécula de unión a antígenos como se describe en este documento y el receptor Fcγ, se pueden usar adecuadamente condiciones en un intervalo de pH ácido o en un intervalo de pH neutro. El intervalo de pH neutro, como condición para medir la actividad de unión de la región Fc y el receptor Fcγ contenido en la molécula de unión a antígenos como se describe en este documento, generalmente indica un pH de 6,7 a un pH de 10,0. Preferiblemente, es un intervalo indicado con valores de pH arbitrarios entre pH 7,0 y pH 8,0; y preferiblemente, se selecciona de pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4, pH 7,5, pH 7,6, pH 7,7, pH 7,8, pH 7,9 y pH 8,0; y de manera particularmente preferida, es un pH de 7,4, que está cerca del pH del plasma (sangre) *in vivo*. En este documento, el intervalo de pH ácido, como condición para tener una actividad de unión de la región Fc y el receptor Fcγ contenido en la molécula de unión a antígenos como se describe

en el presente documento, generalmente indica un pH de 4,0 a un pH de 6,5. Preferiblemente, indica pH 5,5 a pH 6,5, y en particular preferiblemente, indica pH 5,8 a pH 6,0, que está cerca del pH en los endosomas tempranos *in vivo*. Con respecto a la temperatura usada como condición de medición, la afinidad de unión entre una región Fc y un receptor Fc γ puede evaluarse a cualquier temperatura entre 10 °C y 50 °C. Preferiblemente, se usa una temperatura entre 15 °C y 40 °C para determinar la afinidad de unión entre una región Fc y un receptor Fc γ . Más preferiblemente, cualquier temperatura entre 20 °C y 35 °C, como cualquier temperatura única de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C y 35 °C, se pueden usar de manera similar para determinar la afinidad de unión entre una región Fc y un receptor Fc γ . Una temperatura de 25 °C es un ejemplo no limitante en una realización de la presente descripción.

En este documento, "la región Fc con unión a Fc γ R modificada tiene una actividad de unión al receptor Fc γ más alta que la región Fc nativa" significa que la actividad de unión al receptor Fc γ humano de la región Fc con unión a Fc γ R modificada hacia cualquiera de los receptores Fc γ humanos de Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa y/o Fc γ RIIIb es mayor que la actividad de unión de la región Fc nativa hacia estos receptores Fc γ humanos. Por ejemplo, significa que en base a un método analítico descrito anteriormente, en comparación con la actividad de unión de una molécula de unión a antígenos que contiene una región Fc de IgG humana nativa como control, la actividad de unión de la molécula de unión a antígenos que comprende un Fc región con unión de Fc γ R modificada es 105 % o más, preferiblemente 110 % o más, 115 % o más, 120 % o más, 125 % o más, en particular preferiblemente 130 % o más, 135 % o más, 140 % o más, 145 % o más, 150 % o más, 155 % o más, 160 % o más, 165 % o más, 170 % o más, 175 % o más, 180 % o más, 185 % o más, 190 % o más, 195 % o más, 2 o más veces, 2,5 o más veces, 3 o más veces, 3,5 o más veces, 4 o más veces, 4,5 o más veces, 5 o más veces, 7,5 o más veces, 10 o más veces, 20 o más veces, 30 o más veces, 40 o más veces, 50 o más veces, 60 o más veces, 70 o más veces, 80 o más veces, 90 o más veces, o 100 o más veces mayor. La región Fc de partida puede usarse como región Fc nativa, y también pueden usarse regiones Fc nativas de anticuerpos de la misma subclase.

Una región Fc de una IgG humana nativa en la que la cadena de azúcar unida al aminoácido en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa, se usa adecuadamente como una región Fc nativa de IgG humana para usarse como control. Se puede determinar si la cadena de azúcar unida al aminoácido en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa utilizando la técnica descrita en el documento que no es de patente 6. Por ejemplo, es posible determinar si la cadena de azúcar unida a la región Fc de una IgG humana nativa es una cadena de azúcar que contiene fucosa mediante un método como el que se muestra a continuación. La cadena de azúcar se disocia de una IgG humana nativa que se va a analizar, haciendo reaccionar la IgG humana nativa de ensayo con *N*-glucosidasa F (diagnóstico de Roche) (Weitzhandler *et al.* (J. Pharma. Sciences (1994), 83, 12, 1670-1675). A continuación, un concentrado seco de una disolución de reacción de la que se ha eliminado la proteína por reacción con etanol (Schenk *et al.* (J. Clin. Investigation (2001), 108 (11) 1687-1695)) se marca con fluorescencia con 2-aminopiridina (Bigge *et al.* (Anal. Biochem. (1995), 230 (2) 229-238)). Los reactivos se eliminan mediante extracción de sólidos utilizando un cartucho de celulosa, y la cadena de azúcar modificada con 2-AB marcada con fluorescencia se analiza mediante cromatografía de fase normal. Es posible determinar si la cadena de azúcar unida a la región Fc nativa de una IgG humana es una cadena de azúcar que contiene fucosa observando los picos del cromatograma detectados.

Como molécula de unión a antígenos que contiene una región Fc de un anticuerpo nativo de la misma subclase, que se va a usar como control, se puede usar adecuadamente una molécula de unión a antígenos que tiene una región Fc de un anticuerpo IgG monoclonal. Las estructuras de las regiones Fc se describen en SEQ ID NO:9 (se añade A al extremo N de RefSeq n.º de registro AAC82527.1), SEQ ID NO:10 (A se añade al terminal N de RefSeq n.º de registro AAB59393.1), SEQ ID NO:11 (RefSeq n.º de registro CAA27268.1) y SEQ ID NO:12 (A se añade al término N de RefSeq n.º de registro AAB59394.1). Además, cuando una molécula de unión a antígenos que contiene una región Fc de un isotipo de anticuerpo particular se usa como sustancia de ensayo, el efecto de la molécula de unión a antígenos que contiene la región Fc de ensayo sobre la actividad de unión al receptor Fc γ se ensaya usando como control una molécula de unión a antígenos que tiene una región Fc de un anticuerpo IgG monoclonal de ese isotipo particular. De esta forma, las moléculas de unión a antígenos que contienen una región Fc que ha demostrado tener una alta actividad de unión al receptor Fc γ se seleccionan adecuadamente.

Regiones Fc que tienen una actividad de unión selectiva a un receptor Fc γ

Los ejemplos de regiones Fc adecuadas para su uso en la presente descripción incluyen regiones Fc que tienen una mayor actividad de unión a un receptor Fc γ particular que a otros receptores Fc γ (regiones Fc que tienen una actividad de unión selectiva a un receptor Fc γ). Cuando se usa un anticuerpo como molécula de unión a antígenos, una única molécula de anticuerpo solo puede unirse a una única molécula de receptor Fc γ . Por lo tanto, una sola molécula de unión a antígenos no puede unirse a otros Fc γ R activadores en un estado de unión a un receptor Fc γ inhibitorio, y no puede unirse a otros receptores Fc γ activadores o receptores Fc γ inhibitorios en un estado de unión a un receptor Fc γ activador.

Como se describió anteriormente, los ejemplos adecuados de receptores Fc γ activadores incluyen Fc γ RI (CD64) que incluye Fc γ RIa, Fc γ RIb y Fc γ RIc; Fc γ RIII (CD16) que incluye las isoformas Fc γ RIIIa (incluidos los alotipos V158 y F158) y Fc γ RIIIb (incluidos los alotipos Fc γ RIIIb-NA1 y Fc γ RIIIb-NA2); y Fc γ RIIa (incluidos los alotipos H131 y R131). Por otra parte, los ejemplos adecuados de receptores Fc γ inhibitorios incluyen Fc γ RIIb (que incluye Fc γ RIIb-1 y Fc γ RIIb-2).

En la presente, un ejemplo de un caso en el que la actividad de unión hacia un determinado receptor Fc γ es mayor que la actividad de unión hacia otro receptor Fc γ es el caso en el que la actividad de unión hacia un receptor Fc γ inhibidor es mayor que la actividad de unión hacia un receptor Fc γ activador. En este caso, se dice que la actividad de unión de la región Fc hacia Fc γ R1Ib es mayor que la actividad de unión hacia cualquiera de los receptores Fc γ humanos de Fc γ R1a, Fc γ R1Ia, Fc γ R1IIa y/o Fc γ R1IIb. Por ejemplo, esto significa que, basándose en un método analítico descrito anteriormente, la actividad de unión de una molécula de unión a antígenos que contiene la región Fc hacia Fc γ R1Ib es 105 % o más, preferiblemente 110 % o más, 120 % o más, 130 % o más, 140 % o más, en particular preferiblemente 150 % o más, 160 % o más, 170 % o más, 180 % o más, 190 % o más, 200 % o más, 250 % o más, 300 % o más, 350 % o más, 400 % o más, 450 % o más, 500 % o más, 750 % o más, 10 o más veces, 20 o más veces, 30 o más veces, 40 o más veces, 50 -veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 o más veces mayor en comparación con la actividad de unión hacia cualquiera de los receptores Fc γ humanos de Fc γ R1a, Fc γ R1Ia, Fc γ R1IIa y/o Fc γ R1IIb.

En una realización no limitante, un ejemplo preferido de una región Fc que tiene una mayor actividad de unión al receptor Fc γ inhibidor que una actividad de unión al receptor Fc γ activador (que tiene una actividad de unión selectiva hacia un receptor Fc γ inhibidor) es una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 o 328, como se indica por la numeración EU en la región Fc antes mencionada, se ha alterado a un aminoácido diferente del de la región Fc nativa.

En una realización no limitante, un ejemplo adecuado de una región Fc que tiene una mayor actividad de unión hacia un receptor Fc γ inhibidor que hacia un receptor Fc γ activador (es decir, que tiene una actividad de unión selectiva hacia un receptor Fc γ inhibido) es una región Fc con una o más de las siguientes alteraciones en los aminoácidos (indicados por la numeración EU) de la región Fc antes mencionada: el aminoácido en la posición 238 está cambia a Asp y el aminoácido de la posición 328 se cambia a Glu. Las regiones Fc y alteraciones descritas en el documento US2009/0136485 puede seleccionarse apropiadamente como la región Fc que tiene una actividad de unión selectiva a un receptor Fc γ inhibidor.

En una realización no limitante, un ejemplo adecuado es una región Fc en la que uno o más de los aminoácidos indicados por la numeración EU en las posiciones 238 y 328 según la numeración EU están respectivamente alterados a Asp o Glu en la región Fc antes mencionada.

Además, en una realización no limitante, los ejemplos adecuados de las regiones Fc son aquellas con sustitución de Asp por Pro en la posición 238 (numeración EU), y una o más alteraciones seleccionadas entre Trp para el aminoácido en la posición 237, Phe para el aminoácido en la posición 237, Val para el aminoácido en la posición 267, Gln para el aminoácido en la posición 267, Asn para el aminoácido en la posición 268, Gly para el aminoácido en la posición 271, Leu para el aminoácido en la posición 326, Gln para el aminoácido en la posición 326, Glu para el aminoácido en la posición 326, Met para el aminoácido en la posición 326, Asp para el aminoácido en la posición 239, Ala para el aminoácido en la posición 267, Trp para el aminoácido en la posición 234, Tyr para el aminoácido en la posición 234, Ala para el aminoácido en la posición 237, Asp para el aminoácido en la posición 237, Glu para el aminoácido en la posición 237, Leu para el aminoácido en la posición 237, Met para el aminoácido en la posición 237, Tyr para el aminoácido en la posición 237, Lys para el aminoácido en la posición 330, Arg para el aminoácido en la posición 330, Asp para el aminoácido en la posición 233, Asp para el aminoácido en la posición 268, Glu para el aminoácido en la posición 268, Asp para el aminoácido ácido en la posición 326, Ser para el aminoácido en la posición 326, Thr para el aminoácido en la posición 326, Ile para el aminoácido en la posición 323, Leu para el aminoácido en la posición 323, Met para el aminoácido en la posición 323, Asp para el aminoácido en la posición 296, Ala para el aminoácido en la posición 326, Asn para el aminoácido en la posición 326 y Met para el aminoácido en la posición 330, según la numeración EU.

Molécula de unión a antígenos

Como se usa en el presente documento, una "molécula de unión a antígenos" se usa en el sentido más amplio para referirse a una molécula que contiene un dominio de unión al antígeno y una región Fc. Específicamente, las moléculas de unión a antígenos incluyen varios tipos de moléculas siempre que presenten la actividad de unión a antígenos. Las moléculas en las que un dominio de unión al antígeno está unido a una región Fc incluyen, por ejemplo, anticuerpos. Los anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales individuales (incluidos anticuerpos agonistas y anticuerpos antagonistas), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y similares. Como alternativa, cuando se usan como fragmentos de anticuerpos, preferiblemente incluyen dominios de unión al antígeno y fragmentos de unión al antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, scFv y Fv). También se incluyen en las moléculas de unión a antígenos descritas en la presente las moléculas de andamiaje en las que las estructuras tridimensionales, como la estructura de la proteína de barril α/β estable ya conocida, se utilizan como andamiaje (base), y solo algunas porciones de las estructuras se constituyen como bancos para construir dominios de unión al antígeno.

Una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento puede contener al menos algunas porciones de una región Fc que media en la unión al receptor FcRn y Fc γ . En una realización no limitante, la molécula de unión a antígenos incluye, por ejemplo, anticuerpos y proteínas de fusión de Fc. Una proteína de fusión se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido que tiene una primera secuencia de aminoácidos que está unida a un polipéptido que tiene una segunda secuencia de aminoácidos con la que no se uniría naturalmente en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender la secuencia de aminoácidos que codifica al menos una parte de una región Fc (por ejemplo, una parte de una región Fc responsable de la unión a FcRn o una parte de

una región Fc responsable de la unión al receptor Fcγ) y un polipéptido que no es de inmunoglobulina que contiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que codifica el dominio de unión al ligando de un receptor o un dominio de unión al receptor de un ligando. Las secuencias de aminoácidos pueden estar presentes en proteínas distintas que se transportan juntas hasta una proteína de fusión, o generalmente pueden estar presentes en una sola proteína; sin embargo, están incluidas en una nueva redistribución en un polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden producir, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante técnicas de recombinación genética para expresar un polinucleótido que codifica regiones peptídicas en una disposición deseada.

Cada uno de los dominios del dominio de unión al antígeno, la región Fc y demás pueden unirse entre sí a través de conectores o directamente a través de unión de polipéptidos. Los conectores comprenden conectores peptídicos arbitrarios que pueden introducirse mediante ingeniería genética, conectores sintéticos y conectores descritos, por ejemplo, en Protein Engineering (1996), 9 (3), 299-305. Sin embargo, se prefieren los conectores peptídicos. La longitud de los conectores peptídicos no está en particular limitada y los expertos en la técnica pueden seleccionarla adecuadamente de acuerdo con el propósito. La longitud es preferiblemente de cinco aminoácidos o más (sin limitación particular, el límite superior es generalmente 30 aminoácidos o menos, preferiblemente 20 aminoácidos o menos), y en particular preferiblemente 15 aminoácidos.

Por ejemplo, tales conectores peptídicos incluyen preferiblemente:

Ser

Gly·Ser

Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly

Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO:25)

Ser·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO:26)

Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO:27)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO:28)

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO:29)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO:30)

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO:31)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO:32)

(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO:27))_n

(Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO:28))_n

[en los que n es un número entero de 1 o mayor]. Los expertos en la técnica pueden seleccionar en consecuencia la longitud o las secuencias de los conectores peptídicos dependiendo del propósito.

Los conectores sintéticos (agentes de entrecruzamiento químico) se utilizan habitualmente para entrecruzar péptidos, por ejemplo:

N-hidroxisuccinimida (NHS),

suberato de disuccinimidilo (DSS),

suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3),

ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP),

ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP),

bis(succinato de succinimidilo)-etilenglicol (EGS),

bis(succinato de sulfosuccinimidilo)-etilenglicol (sulfo-EGS),

tartrato de disuccinimidilo (DST),

tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST),

bis [2-(succinimidoxicarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES),

y bis [2-(sulfosuccinimidoxicarbonilo)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de entrecruzamiento están disponibles comercialmente.

5 Cuando se utilizan múltiples conectores para conectar los respectivos dominios, todos pueden ser del mismo tipo o pueden ser de diferentes tipos.

Además de los conectores ejemplificados anteriormente, también pueden usarse de forma adecuada conectores con marcadores peptídicos tales como marcador His, marcador HA, marcador myc y marcador FLAG. Además, pueden usarse de forma adecuada enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro, enlaces covalentes, interacción iónica y propiedades de unión entre sí como resultado de la combinación de los mismos. Por ejemplo, se puede usar la afinidad entre CH1 y CL del anticuerpo, y las regiones Fc que se originan a partir de los anticuerpos biespecíficos descritos anteriormente también se pueden usar para la asociación de la región hetero Fc. Además, los enlaces disulfuro formados entre dominios también pueden usarse de manera adecuada.

15 Para conectar los respectivos dominios a través de un enlace peptídico, los polinucleótidos que codifican los dominios se conectan dentro de marco. Los métodos conocidos para unir polinucleótidos dentro de marco incluyen técnicas tales como acoplamiento de fragmentos de restricción, PCR de fusión y PCR superpuesta. Dichos métodos pueden usarse apropiadamente solos o en combinación para producir las moléculas de unión a antígenos como se describe en este documento. En este documento, los términos "conectado" y "condensado" o "enlace" y "fusión" se utilizan indistintamente. Estos términos significan que dos o más elementos o componentes, tales como polipéptidos, están unidos entre sí para formar una estructura única por cualquier medio, incluidos los medios de unión química y las técnicas de recombinación descritos anteriormente. Cuando dos o más elementos o componentes son polipéptidos, la fusión dentro de marco significa unir dos o más unidades de marcos de lectura para formar un marco de lectura continuo más largo, al mismo tiempo que se mantienen los marcos de lectura correctos de los polipéptidos. Cuando se utilizan dos moléculas de Fab como dominio de unión a antígeno, puede usarse un anticuerpo que es una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento en el que el dominio de unión al antígeno se une dentro de marco a una región Fc mediante un enlace peptídico y no a través de un conector, como una molécula de unión a antígenos adecuada de la presente solicitud.

Molécula de unión a antígenos que elimina los antígenos agregados con preferencia a los antígenos no agregados del plasma

30 Mediante la selección de una molécula de unión a antígenos con mayor actividad de unión a un antígeno agregado que a un antígeno no agregado como molécula de unión a antígenos de la presente descripción, su efecto de eliminación puede incrementarse aún más. Dichas moléculas de unión a antígenos se pueden obtener de entre las moléculas de unión a antígenos producidas de acuerdo con el método descrito más adelante para producir moléculas de unión a antígenos seleccionando moléculas de unión a antígenos con mayor diferencia en sus actividades de unión para antígenos agregados y antígenos no agregados.

35 El efecto de eliminación también se puede potenciar seleccionando moléculas de unión a antígenos que se unen a epítopos que son específicos de antígenos agregados. Las moléculas de unión a antígenos que se unen a tales epítopos pueden obtenerse usando métodos conocidos. Por ejemplo, pueden obtenerse obteniendo moléculas que se unen a un antígeno agregado y luego comparando la unión de esas moléculas que se unen al antígeno con el antígeno agregado y el antígeno no agregado, y seleccionando moléculas que se unen al antígeno que tienen una mayor unión al antígeno agregado (documento WO 2006/016644; EMBO J. (1994), 13, 1166-75; documento WO 2009/008529; y similares).

40 Además, el efecto de eliminación se puede mejorar seleccionando una molécula de unión a antígenos que tenga una mayor actividad de unión a un receptor Fcγ o al FcRn de un complejo formado entre un antígeno agregado y una molécula de unión a antígenos, que su actividad de unión a un receptor Fcγ o al FcRn de un complejo formado entre un antígeno no agregado y la molécula de unión a antígenos. Dicha molécula de unión a antígenos se puede obtener, por ejemplo, introduciendo en una molécula de unión a antígenos obtenida de acuerdo con el método descrito más adelante para producir moléculas de unión a antígeno, alteraciones que produzcan el efecto mencionado anteriormente de mejorar la unión a un receptor Fcγ o un FcRn, permitiendo la formación de complejos entre la molécula de unión a antígenos alterada y un antígeno agregado o entre la molécula de unión a antígenos alterada y un antígeno no agregado, y luego seleccionando una molécula de unión a antígenos que muestra una gran diferencia en su actividad de unión al receptor Fcγ o FcRn de los complejos.

55 Se puede confirmar si un antígeno agregado se elimina con preferencia a un antígeno no agregado comparando la eliminación plasmática del antígeno agregado y la eliminación plasmática del antígeno no agregado. Específicamente, si la proporción entre la eliminación de un antígeno agregado en presencia de una molécula de unión a antígenos de ensayo y la eliminación de un antígeno agregado en ausencia de la molécula de unión a antígenos (eliminación de un antígeno agregado en presencia de la molécula de unión a antígenos/ eliminación de un antígeno agregado en ausencia de la molécula de unión a antígenos) es mayor que la proporción de eliminación del antígeno no agregado (eliminación del antígeno no agregado en presencia de la molécula de unión a antígenos/eliminación del antígeno no agregado en ausencia de la molécula de unión a antígenos), se puede determinar que la molécula de unión a antígenos

elimina el antígeno agregado con preferencia al antígeno no agregado. En la presente invención, la proporción de eliminación del antígeno agregado es preferiblemente al menos 1,5 veces la proporción de eliminación del antígeno no agregado (proporción de eliminación del antígeno agregado/proporción de eliminación del antígeno no agregado).

Siempre que el uso de la molécula de unión a antígenos pueda eliminar el antígeno agregado del plasma, la realización de su uso no está en particular limitada. Los ejemplos de una realización no limitante de tal uso son las composiciones farmacéuticas que contienen una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento y los métodos que comprenden administrar a un sujeto tal molécula de unión a antígenos. Un ejemplo de otra realización no limitante es el uso de la molécula de unión a antígenos en un método *ex vivo* para eliminar antígenos agregados del plasma, que incluye poner en contacto un complejo inmune formado a través del contacto de una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento con plasma aislado de un sujeto, y que contiene las moléculas de unión a antígenos y los antígenos agregados con células que expresan el receptor Fcγ o FcRn.

Mejora de la preferencia

Como se usa en este documento, "eliminar el antígeno agregado del plasma" se refiere a la capacidad de eliminar del plasma los antígenos presentes en el plasma cuando se administra una molécula de unión a antígenos *in vivo* o cuando se secreta la molécula de unión a antígenos *in vivo*. Por lo tanto, en la presente invención, se puede decir que "la eliminación plasmática del antígeno agregado por la molécula de unión a antígenos tiene lugar preferentemente" cuando se estimula la eliminación del antígeno agregado en el plasma, en comparación con la del antígeno no agregado cuando se administra la molécula de unión a antígenos. Se puede determinar si la eliminación plasmática del antígeno agregado por la molécula de unión a antígenos tiene lugar preferentemente, por ejemplo, midiendo la proporción de eliminación mencionada anteriormente. La proporción de eliminación mencionada anteriormente se mide para una molécula de unión a antígenos que puede unirse a un antígeno agregado y que muestra cambios en la actividad de unión al antígeno según la concentración de iones, como una disminución de la actividad de unión al antígeno en un intervalo de pH ácido en comparación con el la actividad de unión al antígeno en un intervalo de pH neutro (o actividad de unión al antígeno disminuida en una concentración de ion calcio baja en comparación con la actividad de unión al antígeno en una concentración de ion de calcio alta); y cuando la diferencia relativa a la proporción de eliminación para el antígeno no agregado (proporción de eliminación (antígeno agregado)/proporción de eliminación (antígeno no agregado)) aumenta mucho, se puede determinar que se ha mejorado la preferencia.

Además, si la molécula de unión a antígenos se administra a un organismo o se secreta en un organismo que tiene fluidos biológicos en los que coexisten antígenos agregados y no agregados, y esto provoca una mayor disminución de la concentración en plasma del antígeno agregado que la disminución de la concentración en plasma del antígeno no agregado, en comparación con antes de la administración de la molécula de unión a antígenos, se puede determinar que se ha mejorado la preferencia.

Mejora de la farmacocinética

Como se usa en el presente documento, "potenciación de la farmacocinética", "mejora de la farmacocinética" y "mejor farmacocinética" se pueden reformular como "potenciación de la retención en plasma (sangre)", "mejora de la retención en plasma (sangre)", "mejor retención en plasma (sangre)" y "retención prolongada en plasma (sangre)". Estas expresiones son sinónimas.

Como se usa en este documento, "mejora de la farmacocinética" significa no solo la prolongación del período hasta la eliminación del plasma (por ejemplo, hasta que la molécula de unión a antígenos se degrada intracelularmente o similar y no puede regresar al plasma) después de la administración de la molécula de unión a antígenos a humanos o animales no humanos como ratones, ratas, monos, conejos y perros, pero también la prolongación de la retención en plasma de la molécula de unión a antígenos en una forma que permite la unión al antígeno (por ejemplo, en una forma sin antígeno de la molécula de unión a antígenos) durante el período de administración hasta la eliminación debido a la degradación. La IgG humana que tiene la región Fc de tipo salvaje puede unirse a FcRn de animales no humanos. Por ejemplo, se puede usar preferiblemente la administración a un ratón con el fin de confirmar la propiedad de la molécula de unión a antígenos como se describe en este documento, ya que la IgG humana que tiene una región Fc de tipo salvaje puede unirse al FcRn de ratón con más fuerza que al FcRn humano (Int Immunol. (2001), 13 (12): 1551-1559). Como otro ejemplo, también se puede usar preferiblemente la administración a un ratón en el que sus genes de FcRn nativos están alterados y que alberga un transgén para el gen FcRn humano para ser expresado (Methods Mol Biol., 2010, 602: 93-104) con el fin de confirmar la propiedad de la molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento. Específicamente, la "mejora de la farmacocinética" también incluye la prolongación del período hasta la eliminación debido a la degradación de la molécula de unión a antígenos no unida a los antígenos (la forma sin antígeno de la molécula de unión a antígenos). La molécula de unión a antígenos en el plasma no puede unirse a un nuevo antígeno si la molécula de unión a antígenos ya se ha unido a un antígeno. Por lo tanto, cuanto más largo sea el período en el que la molécula de unión a antígenos no esté unida a un antígeno, mayor será el período en el que pueda unirse a un nuevo antígeno (mayor será la posibilidad de unirse a otro antígeno). Esto permite reducir el período de tiempo en el que un antígeno está libre de la molécula de unión a antígenos *in vivo* y la prolongación del período en el que un antígeno está unido a la molécula de unión a antígenos. La concentración en plasma de la forma sin antígeno de la molécula de unión a antígenos se puede aumentar, y el período en el que el antígeno está unido a la molécula de unión a antígenos se puede prolongar acelerando la eliminación del antígeno del

plasma mediante la administración de la molécula de unión a antígenos. Específicamente, en el presente documento "mejora de la farmacocinética de la molécula de unión a antígenos" incluye la mejora de un parámetro farmacocinético de la forma sin antígeno de la molécula de unión a antígenos (cualquiera de la prolongación de la semivida en plasma, la prolongación del tiempo de retención medio en plasma y la alteración de la eliminación plasmática), la prolongación del período en que el antígeno está unido a la molécula de unión a antígenos después de la administración de la molécula de unión a antígenos, y la aceleración de la eliminación del antígeno del plasma mediada por la molécula de unión a antígenos. La mejora de la farmacocinética de la molécula de unión a antígenos se puede evaluar determinando cualquiera de los parámetros de semivida en plasma, el tiempo medio de retención en plasma y la eliminación plasmática de la molécula de unión a antígenos o la forma libre de antígeno de la misma ("Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice)", Nanzando). Por ejemplo, se determina la concentración en plasma de la molécula de unión a antígenos o su forma sin antígenos después de la administración de la molécula de unión a antígenos a ratones, ratas, monos, conejos, perros o seres humanos. Luego, se determina cada parámetro. Cuando se prolonga la semivida plasmática o el tiempo medio de retención en plasma, se puede considerar que la farmacocinética de la molécula de unión a antígenos mejora. Los parámetros pueden determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los parámetros pueden evaluarse adecuadamente, por ejemplo, mediante análisis no compartimentales utilizando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. La concentración en plasma de la molécula de unión a antígenos sin antígeno se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando el método de ensayo descrito en Clin. Pharmacol., abril 2008, 48 (4): 406-417.

Como se usa en este documento, "mejora de la farmacocinética" también incluye la prolongación del período en el que un antígeno está unido a una molécula de unión a antígenos después de la administración de la molécula de unión a antígenos. Se puede evaluar si se prolonga el período en el que un antígeno está unido a la molécula de unión a antígenos después de la administración de la molécula de unión a antígenos determinando la concentración en plasma del antígeno libre. La prolongación se puede juzgar basándose en la concentración en plasma determinada de antígeno libre o en el período de tiempo requerido para un aumento en la proporción de concentración de antígeno libre a la concentración de antígeno total.

La concentración en plasma del antígeno libre no unido a la molécula de unión a antígenos o la proporción de la concentración del antígeno libre a la concentración de antígeno total se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante el método utilizado en Pharm Res. (2006), enero, 23 (1): 95-103. Como alternativa, cuando un antígeno exhibe una función particular *in vivo*, se puede evaluar si el antígeno está unido a una molécula de unión a antígenos que neutraliza la función del antígeno (molécula antagonista) ensayando si la función del antígeno está neutralizada. Puede evaluarse si la función del antígeno está neutralizada analizando un marcador *in vivo* que refleja la función del antígeno. Puede evaluarse si el antígeno está unido a una molécula de unión a antígenos que activa la función del antígeno (molécula agonista) analizando un marcador *in vivo* que refleja la función del antígeno.

La determinación de la concentración en plasma del antígeno libre y la proporción de la cantidad de antígeno libre en plasma a la cantidad de antígeno total en plasma, el ensayo de marcador *in vivo* y las mediciones de este tipo no están en particular limitadas; sin embargo, los ensayos se llevan a cabo preferiblemente después de que haya pasado un cierto período de tiempo después de la administración de la molécula de unión a antígenos. El período posterior a la administración de la molécula de unión a antígenos no está en particular limitado; los expertos en la técnica pueden determinar el período apropiado dependiendo de las propiedades y similares de la molécula de unión a antígenos administrada. Dichos períodos incluyen, por ejemplo, un día después de la administración de la molécula de unión a antígenos, tres días después de la administración de la molécula de unión a antígenos, siete días después de la administración de la molécula de unión a antígenos, 14 días después de la administración de la molécula de unión a antígenos y 28 días después de la administración de la molécula de unión a antígenos. Como se usa en este documento, el concepto "concentración del antígeno en plasma" comprende tanto la "concentración de antígeno total en plasma" que es la suma del antígeno unido a la molécula de unión a antígenos y la concentración de antígeno no unido, o la "concentración del antígeno libre en plasma" que es la concentración del antígeno no unido a la molécula de unión a antígenos.

La concentración total del antígeno en el plasma se puede reducir mediante la administración, como molécula de unión a antígenos, de la molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento en 2, 5, 10, 20, 50, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces o incluso más en comparación con la administración de una molécula de unión a antígenos que contiene un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno es independiente de la concentración de iones o una molécula de unión a antígenos que contiene una región Fc con una actividad de unión a FcγR alterada, o en comparación con cuando no se administra la molécula del dominio de unión al antígeno como se describe en el presente documento.

La proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos se puede calcular como se muestra a continuación:

valor A: concentración molar de antígeno en cada momento

valor B: concentración molar de molécula de unión a antígenos en cada momento

valor C: concentración molar de antígeno por concentración molar de molécula de unión a antígenos (proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos) en cada momento

$$C = A/B.$$

Un valor menor C indica una mayor eficacia de eliminación del antígeno por molécula de unión a antígenos, mientras que un valor mayor C indica menor eficacia de eliminación del antígeno por molécula de unión a antígenos.

La administración de una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento puede reducir la proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos en 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 veces, 1000 veces o más en comparación con la administración de moléculas de unión a antígenos que no pueden formar los complejos inmunes descritos como se describe en este documento, moléculas de unión a antígenos que contienen dominios de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno es independiente de las concentraciones de iones, o moléculas de unión a antígenos que contienen regiones Fc con actividad de unión comprometida hacia FcγR o FcRn.

Como referencia para la comparación con las moléculas de unión a antígenos que se describen en este documento, se pueden emplear moléculas de unión a antígenos que no pueden formar los complejos inmunes descritos en este documento, moléculas de unión a antígenos que contienen dominios de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno es independiente de las concentraciones de iones o moléculas de unión a antígenos que contienen regiones Fc con actividad de unión comprometida hacia FcγR o FcRn.

Cuando se usa una vía mediada por FcRn en la incorporación de moléculas de unión a antígenos como se describe en este documento desde el plasma hacia el interior de las células, la reducción en la concentración total de antígeno en plasma o la proporción molar de antígeno/anticuerpo también se puede evaluar usando la línea 32 o la línea 276 de ratón de FcRn transgénico humano (Jackson Laboratories, Methods Mol. Biol. (2010), 602: 93-104) mediante el modelo de coinyección de antígeno-anticuerpo o el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario cuando la molécula de unión a antígenos no reacciona de forma cruzada con el antígeno homólogo de ratón. Cuando la molécula de unión a antígenos reacciona de forma cruzada con el homólogo de ratón, también pueden evaluarse simplemente inyectando la molécula de unión a antígenos a la línea 32 o la línea 276 de ratón de FcRn transgénico humano (Jackson Laboratories). En el modelo de coinyección, se administra a los ratones una mezcla de la molécula de unión a antígenos y el antígeno. En el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario, la bomba de infusión llena de una disolución de antígeno se incrusta en ratones para lograr una concentración de antígeno en plasma constante, y luego se inyecta a los ratones la molécula de unión a antígenos. Las moléculas de unión a antígenos de ensayo se administran a la misma dosificación. La concentración total de antígeno en plasma, la concentración de antígeno libre en plasma y la concentración de la molécula de unión a antígenos en plasma se miden en momentos apropiados usando un método conocido por los expertos en la técnica.

Cuando se usa una vía mediada por FcγR en la incorporación de moléculas de unión a antígenos como se describe en el presente documento desde el plasma hacia el interior de las células, la reducción en la concentración total de antígeno en plasma o la proporción molar de antígeno/anticuerpo puede evaluarse mediante el modelo de coinyección de antígeno-anticuerpo o el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario utilizando los ratones C57BL/6J utilizados convencionalmente (Charles River Japan) cuando la molécula de unión a antígenos no reacciona de forma cruzada con el antígeno homólogo de ratón. Si la molécula de unión a antígenos reacciona de forma cruzada con el homólogo de ratón, la evaluación se puede llevar a cabo simplemente inyectando la molécula de unión a antígenos en los ratones C57BL/6J usados convencionalmente (Charles River Japón).

En el modelo de coinyección, se administra a los ratones una mezcla de la molécula de unión a antígenos y el antígeno. En el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario, se incrusta en los ratones una bomba de infusión llena de una disolución de antígeno para lograr una concentración constante de antígeno en plasma, y luego se inyecta en los ratones la molécula de unión a antígenos. Las moléculas de unión a antígenos de ensayo se administran a la misma dosis. La concentración total de antígeno en plasma, la concentración de antígeno libre en plasma y la concentración de la molécula de unión a antígenos en plasma se miden en momentos apropiados usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La concentración total de antígeno o de antígeno libre en plasma y la proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos se pueden medir a los 2, 4, 7, 14, 28, 56 u 84 días después de la administración para evaluar el efecto a largo plazo. En otras palabras, una concentración de antígeno en plasma a largo plazo se determina midiendo la concentración total de antígeno o de antígeno libre en plasma y la proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos a los 2, 4, 7, 14, 28, 56 u 84 días después de la administración de un molécula de unión a antígenos para evaluar la propiedad de la molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento. Puede determinarse si se logra la reducción de la concentración de antígeno en plasma o la proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos por medio de la molécula de unión a antígenos como se describe en este documento, mediante la evaluación de la reducción en uno cualquiera o más de los momentos descritos anteriormente.

La concentración total de antígeno o de antígeno libre en plasma y la proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos se pueden medir 15 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 o 24 horas después de la administración para evaluar el efecto a corto plazo. En otras palabras, una concentración de antígeno en plasma a corto plazo se determina midiendo la

concentración total de antígeno o de antígeno libre en el plasma y la proporción molar de antígeno/molécula de unión a antígenos a los 15 min, 1, 2, 4, 8, 12 o 24 horas después de la administración de una molécula de unión a antígenos para evaluar la propiedad de la molécula de unión a antígenos como se describe en este documento.

La vía de administración de una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento puede seleccionarse entre inyección intradérmica, intravenosa, intravítrea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral e intramuscular.

Es preferible que se mejore la farmacocinética de la molécula de unión a antígenos en humanos. Cuando la retención en plasma en humanos es difícil de determinar, esta puede predecirse basándose en la retención en plasma en ratones (por ejemplo, ratones normales, ratones transgénicos que expresan antígenos humanos, ratones transgénicos que expresan FcRn humano) o monos (por ejemplo, monos cynomolgus).

Como se usa en este documento, "la mejora de la farmacocinética y la retención prolongada en plasma de una molécula de unión a antígenos" significa la mejora de cualquier parámetro farmacocinético (cualquiera de la prolongación de la semivida en plasma, la prolongación del tiempo medio de retención en plasma, la reducción de la eliminación plasmática y la biodisponibilidad) después de la administración *in vivo* de la molécula de unión a antígenos, o un aumento en la concentración de la molécula de unión a antígenos en el plasma en un momento apropiado después de la administración. Puede determinarse midiendo cualquier parámetro, como la semivida en plasma, el tiempo medio de retención en plasma, la eliminación plasmática y la biodisponibilidad de la molécula de unión a antígenos (Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice), Nanzando). Por ejemplo, cuando se administra una molécula de unión a antígenos a ratones (ratones normales y ratones FcRn transgénicos humanos), ratas, monos, conejos, perros, humanos, etc., y la concentración de la molécula de unión a antígenos en el plasma se determina y se calcula cada uno de los parámetros, se puede considerar que la farmacocinética de la molécula de unión a antígenos mejora cuando se prolonga la semivida media en plasma o el tiempo medio de retención en el plasma. Estos parámetros pueden determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los parámetros pueden evaluarse adecuadamente mediante análisis no compartimentales utilizando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

Si bien no está vinculado a una teoría en particular, se presenta un mecanismo como el descrito en el análisis de los ejemplos descritos más adelante como un ejemplo de un mecanismo que puede producirse cuando una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento, que se une a un antígeno agregado y que comprende una región Fc y un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de la concentración de iones, elimina el antígeno agregado del plasma.

Si un anticuerpo que contiene una región constante de tipo IgG1 nativa contra un antígeno agregado y que muestra una unión dependiente de pH o de Ca puede formar un gran complejo inmune y unirse a FcγR, FcRn, receptores del complemento y similares con avidéz, se cree que la eliminación del antígeno agregado puede acelerarse de manera preferente y en gran medida. Se cree que cuando se administra GA2-IgG1 que se une a la IgA humana agregada, se forman tales complejos inmunes grandes. Se cree que GA2-IgG1 es capaz de acelerar en gran medida la eliminación de la IgA humana agregada porque el complejo inmune que comprende GA2-IgG1 e IgA humana, que es un antígeno agregado unido a un receptor Fc como FcRn o FcγR con avidéz, se incorpora rápidamente en las células que expresan el receptor Fc. La IgA que se disocia del complejo inmune en los endosomas de las células que han absorbido el complejo inmune se degrada en los lisosomas. Al mismo tiempo, el anticuerpo disociado de IgA, que estaba unido a FcRn en los endosomas, se recicla posteriormente al plasma y puede unirse de nuevo a IgA en el plasma. Se cree que la eliminación de la IgA humana en el plasma se acelera enormemente de esta manera. Un método que utiliza una variante de aminoácidos de la región Fc que se une a FcRn en el intervalo de pH neutro se describe en el documento WO2011/122011 como método para acelerar la eliminación de antígenos del plasma. La presente descripción es útil como un método para acelerar la eliminación del plasma de antígenos agregados sin usar las variantes mencionadas anteriormente, y puede acelerar aún más la eliminación de los antígenos agregados del plasma mediante la combinación con las variantes mencionadas anteriormente. Además, los antígenos agregados pueden eliminarse, además del plasma, del líquido intersticial, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pleural y líquido pericárdico, siempre que las células en contacto con el líquido intersticial, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pleural, o el líquido pericárdico expresan FcγR o FcRn. Una realización no limitante de tales células incluye células inmunes y similares presentes en el líquido intersticial, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pleural y líquido pericárdico.

Método ex vivo para eliminar antígenos agregados del plasma

Un ejemplo de una realización no limitante del uso de una molécula de unión a antígenos en el método proporcionado por la presente descripción para eliminar antígenos agregados del plasma incluye el uso de la molécula de unión a antígenos en un denominado método *ex vivo* para eliminar antígenos agregados del plasma, que incluye la formación de un complejo inmune que contiene las moléculas de unión a antígenos y los antígenos agregados, que permite que las moléculas de unión a antígenos como se describen en este documento entren en contacto con el plasma aislado de un sujeto, y que el complejo inmune entre en contacto con las células que expresan receptores FcRn y/o Fcγ.

Además, un ejemplo de una realización no limitante del uso de una molécula de unión a antígenos en el método proporcionado en el presente documento para eliminar antígenos agregados del plasma incluye el uso de la molécula

de unión a antígenos en un denominado método *ex vivo* para eliminar antígenos agregados del plasma, que incluye poner en contacto un complejo inmune que contiene las moléculas de unión a antígenos y los antígenos agregados presentes en el plasma aislado de un sujeto al que se le administran las moléculas de unión a antígenos como se describe en este documento, con células que expresan FcRn y/o receptores Fcγ.

Se puede confirmar si un antígeno agregado se elimina del plasma con preferencia a un antígeno no agregado del plasma, por ejemplo, comparando y evaluando la proporción de eliminación plasmática antes mencionada para el antígeno agregado (eliminación del antígeno agregado en presencia de la molécula de unión a antígenos/eliminación del antígeno agregado en ausencia de la molécula de unión a antígenos) y la proporción de eliminación del antígeno no agregado (eliminación del antígeno no agregado en presencia de la molécula de unión a antígenos/eliminación del antígeno no agregado en ausencia de la molécula de unión a antígenos).

Método de producción de moléculas de unión a antígenos que contienen una región Fc y un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno depende de la concentración de iones

En una realización no limitante, después de aislar un polinucleótido que codifica un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión cambia dependiendo de la condición seleccionada como se describe anteriormente, el polinucleótido se inserta en un vector de expresión apropiado. Por ejemplo, cuando el dominio de unión al antígeno es una región variable de anticuerpo, una vez que se obtiene un ADNc que codifica la región variable, el ADNc se digiere con enzimas de restricción que reconocen los sitios de restricción insertados en los dos extremos del ADNc. Preferiblemente, las enzimas de restricción reconocen y digieren una secuencia de nucleótidos que aparece con una frecuencia baja en la secuencia de nucleótidos que componen el gen de la molécula de unión a antígenos. Además, las enzimas de restricción que proporcionan extremos cohesivos se insertan preferiblemente para insertar una única copia de un fragmento digerido en el vector en la orientación correcta. El ADNc que codifica una región variable de una molécula de unión a antígenos digerida como se describió anteriormente se inserta en un vector de expresión apropiado para obtener un vector de expresión para la molécula de unión a antígenos como se describe en este documento. En este momento, un gen que codifica una región constante de anticuerpo (región C) puede condensarse dentro de marco con el gen que codifica la región variable.

Para producir una molécula de unión a antígenos de interés, se inserta un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígenos de una manera unida operativamente a una secuencia reguladora en un vector de expresión. Las secuencias reguladoras incluyen, por ejemplo, potenciadores y promotores. Además, se puede unir una secuencia señal apropiada al extremo amino de modo que la molécula de unión a antígenos expresada se secrete al exterior de las células. Como secuencia señal, por ejemplo, se usa un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:1); sin embargo, también es posible unir otras secuencias señal apropiadas. El polipéptido expresado se escinde en el extremo carboxilo terminal de la secuencia descrita anteriormente y el polipéptido escindido se secreta como polipéptido maduro al exterior de las células. Luego, las células hospedantes apropiadas se transforman con este vector de expresión de modo que se puedan obtener células recombinantes que expresan el polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígenos de interés. Las moléculas de unión a antígenos que se describen en el presente documento se pueden producir a partir de células recombinantes siguiendo los métodos descritos anteriormente en la sección "Anticuerpo".

Para un ácido nucleico, "unido operativamente" significa que el ácido nucleico tiene una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un ADN que codifica una presecuencia o un conductor de secreción se une operativamente a un ADN que codifica un determinado polipéptido si se va a expresar como una proteína precursora implicada en la secreción del polipéptido. Un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia codificadora. Un sitio de unión a ribosomas está operativamente unido a una secuencia codificadora si está en una posición que facilita la traducción. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN unidas son contiguas, y en el caso de un conductor de la secreción, significa que las secuencias de ADN unidas son contiguas y están dentro de un marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se logra mediante acoplamiento en sitios de restricción adecuados. Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Además, los ácidos nucleicos unidos pueden producirse mediante la técnica de PCR de extensión por solapamiento mencionada anteriormente.

En una realización no limitante, después de aislar un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígenos descrita anteriormente cuya actividad de unión varía dependiendo de una condición seleccionada, se inserta una variante del polinucleótido en un vector de expresión apropiado. Tales variantes incluyen preferiblemente las preparadas mediante humanización basada en la secuencia de polinucleótidos que codifica una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento obtenida mediante la selección como un banco de regiones variables aleatorizadas, un banco sintético o un banco inmunológico construido que se origina a partir de animales no humanos. Los mismos métodos descritos anteriormente para producir anticuerpos humanizados descritos anteriormente pueden usarse como un método para producir variantes de moléculas de unión a antígenos humanizadas.

En otra realización, tales variantes incluyen preferiblemente las obtenidas mediante la introducción de una alteración que aumenta la afinidad por el antígeno (maduración por afinidad) de una molécula de unión a antígenos como se describe en el presente documento, en una secuencia de polinucleótidos aislada para la molécula obtenida mediante

la selección usando un banco sintético o un banco sin exposición como un banco de regiones variables aleatorizadas. Tales variantes se pueden obtener mediante varios procedimientos conocidos para la maduración por afinidad, incluida la mutagénesis de CDR (Yang *et al.* (J. Mol. Biol. (1995), 254, 392-403), reordenamiento de cadenas (Marks *et al.* (Bio/Technology (1992), 10, 779-783), uso de *E. coli* cepas mutantes (Low *et al.* (J. Mol. Biol. (1996), 250, 359-368), reordenamiento de ADN (Patten *et al.* (Curr. Opin. Biotechnol. (1997), 8, 724-733), presentación de fagos (Thompson *et al.* (J. Mol. Biol. (1996), 256, 77-88) y PCR sexual (Clameri *et al.* (Nature (1998), 391, 288-291).

Como se describió anteriormente, las moléculas de unión a antígenos que se producen mediante los métodos de producción descritos en este documento incluyen moléculas de unión a antígenos que tienen una región Fc. Se pueden utilizar diversas variantes como regiones Fc. En una realización, las variantes de la presente descripción incluyen preferiblemente polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígenos que tienen una cadena pesada en la que un polinucleótido que codifica una variante de la región Fc como se describió anteriormente está unido dentro de marco a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígenos descrita anteriormente cuya la actividad de unión varía dependiendo de una condición seleccionada.

En una realización no limitante de la presente invención, las regiones Fc incluyen preferiblemente, por ejemplo, regiones constantes Fc de anticuerpos, tales como IgG1 de SEQ ID NO:9 (Ala se añade al N terminal de AAC82527.1), IgG2 de SEQ ID NO:10 (Ala se añade al N terminal de AAB59393.1), IgG3 de SEQ ID NO:11 (CAA27268.1) e IgG4 de SEQ ID NO:12 (Ala se añade al N terminal de AAB59394.1)). Varias secuencias de alotipo de regiones constantes de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana debidas a polimorfismos génicos se describen en "Sequences of proteins of immunological interest", publicación de NIH N° 91-3242. Cualquiera de dichas secuencias se puede utilizar en la presente invención. En particular, para la secuencia de IgG1 humana, la secuencia de aminoácidos en las posiciones 356 a 358 como se indica mediante la numeración EU puede ser DEL o EEM. La retención plasmática de moléculas de IgG es relativamente prolongada (la eliminación del plasma es lenta) ya que el FcRn, en particular el FcRn humano, funciona como un receptor de rescate para las moléculas de IgG. Las moléculas de IgG incorporadas a los endosomas por pinocitosis se unen en condiciones ácidas endosómicas a FcRn, en particular FcRn humano, expresado en endosomas. Las moléculas de IgG que no pueden unirse a FcRn, en particular FcRn humano, se transfieren a los lisosomas y allí se degradan. Por otra parte, las moléculas de IgG unidas a FcRn, en particular FcRn humano, se transfieren a la superficie celular y luego regresan al plasma como resultado de la disociación de FcRn, en particular FcRn humano, en condiciones neutras en plasma.

Dado que los anticuerpos que comprenden una región Fc típica no tienen actividad de unión a FcRn, en particular a FcRn humano, en condiciones de intervalo de pH neutro en plasma, los anticuerpos típicos y los complejos de anticuerpo-antígeno se incorporan a las células mediante endocitosis no específica y se transfieren a la superficie celular uniéndose a FcRn, en particular FcRn humano, en la condición de intervalo de pH ácido endosómico. El FcRn, en particular FcRn humano, transporta anticuerpos desde el endosoma a la superficie celular. Por tanto, se cree que algunos FcRn, en particular FcRn humanos, también están presentes en la superficie celular. Sin embargo, los anticuerpos se reciclan al plasma, ya que se disociaron de FcRn, en particular FcRn humano, en la condición de intervalo de pH neutro en la superficie celular.

Las regiones Fc que tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, que pueden incluirse en las moléculas de unión a antígenos como se describe en el presente documento, pueden obtenerse mediante cualquier método. Específicamente, las regiones Fc que tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro se pueden obtener alterando los aminoácidos de la inmunoglobulina de tipo IgG humana como región Fc de partida. Las regiones Fc preferidas de la inmunoglobulina de tipo IgG humana para la alteración incluyen, por ejemplo, las de las IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y variantes de las mismas). Los aminoácidos en cualquier posición se pueden alterar por otros aminoácidos siempre que las regiones resultantes tengan la actividad de unión al FcRn humano en el intervalo de pH neutro o la actividad de unión al FcRn humano aumentada en el intervalo neutro. Cuando una molécula de unión a antígenos comprende la región Fc de IgG1 humana como región Fc humana, es preferible que la región resultante comprenda una alteración que provoque el efecto de mejorar la unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro en comparación con la actividad de unión de la región Fc de IgG1 humana de partida. Los aminoácidos que permiten tales alteraciones incluyen, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones 221 a 225, 227, 228, 230, 232, 233 a 241, 243 a 252, 254 a 260, 262 a 272, 274, 276, 278 a 289, 291 a 312, 315 a 320, 324, 325, 327 a 339, 341, 343, 345, 360, 362, 370, 375 a 378, 380, 382, 385 a 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 a 438, 440 y 442 (indicado por la numeración EU). Más específicamente, tales alteraciones de aminoácidos incluyen las enumeradas en la tabla 5. La alteración de estos aminoácidos potencia la unión a FcRn humano de la región Fc de inmunoglobulina de tipo IgG en el intervalo de pH neutro.

Entre las descritas anteriormente, se seleccionan las alteraciones apropiadas que mejoran la unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro para su uso en la presente invención. Los aminoácidos particularmente preferidos para tales variantes de la región Fc incluyen, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones 237, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 y 436 (indicado por numeración EU). La actividad de unión a FcRn humano de la región Fc incluida en una molécula de unión a antígenos puede aumentarse en el intervalo de pH neutro sustituyendo al menos un aminoácido por un aminoácido diferente.

Las alteraciones particularmente preferidas en la región Fc incluyen, por ejemplo, al menos una o más alteraciones de

aminoácidos seleccionadas del grupo de:

Met para el aminoácido en la posición 237;

Ile para el aminoácido en la posición 248;

Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 250;

5 Phe, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 252;

Thr para el aminoácido en la posición 254;

Glu para el aminoácido en la posición 255;

Asp, Asn, Glu o Gln para el aminoácido en la posición 256;

Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 257;

10 His para el aminoácido en la posición 258;

Ala para el aminoácido en la posición 265;

Ala o Glu para el aminoácido en la posición 286;

His para el aminoácido en la posición 289;

Ala para el aminoácido en la posición 297;

15 Ala para el aminoácido en la posición 303;

Ala para el aminoácido en la posición 305;

Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 307;

Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 308;

Ala, Asp, Glu, Pro o Arg para el aminoácido en la posición 309;

20 Ala, His o Ile para el aminoácido en la posición 311;

Ala o His para el aminoácido en la posición 312;

Lys o Arg para el aminoácido en la posición 314;

Ala, Asp o His para el aminoácido en la posición 315;

Ala para el aminoácido en la posición 317;

25 Val para el aminoácido en la posición 332;

Leu para el aminoácido en la posición 334;

His para el aminoácido en la posición 360;

Ala para el aminoácido en la posición 376;

Ala para el aminoácido en la posición 380;

30 Ala para el aminoácido en la posición 382;

Ala para el aminoácido en la posición 384;

Asp o His para el aminoácido en la posición 385;

Pro para el aminoácido en la posición 386;

Glu para el aminoácido en la posición 387;

35 Ala o Ser para el aminoácido en la posición 389;

Ala para el aminoácido en la posición 424;

Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 428;

Lys para el aminoácido en la posición 433;

Ala, Phe, His, Ser, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434; y

His, Ile, Leu, Phe, Thr o Val para el aminoácido en la posición 436 en el sistema de numeración EU. Por otra parte, el número de aminoácidos alterados no está en particular limitado; tales alteraciones de aminoácidos incluyen la alteración de un solo aminoácido y la alteración de aminoácidos en dos o más sitios. Las combinaciones de alteraciones de aminoácidos en dos o más sitios incluyen, por ejemplo, las descritas en las tablas 5-1 a 5-32.

Además de la región Fc de IgG1 (SEQ ID NO:9), IgG2 (SEQ ID NO:10), IgG3 (SEQ ID NO:11) o IgG4 (SEQ ID NO:12) humanas como regiones Fc incluidas en la presente invención, pueden usarse de modo adecuado regiones Fc con unión a FcγR modificada, que tienen una actividad de unión al receptor Fcγ más alta que la región Fc de una IgG humana nativa en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa. Tales regiones Fc con unión a FcγR modificada pueden producirse alterando los aminoácidos en la región Fc de una IgG humana nativa. Se puede determinar de manera apropiada si la actividad de unión a FcγR de una región Fc es mayor que la de la región Fc de una IgG humana nativa, en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa, usando métodos como los descritos anteriormente.

Como se usa en este documento, "alteración de aminoácidos" o "alteración de un aminoácido" de una región Fc incluye la alteración en una secuencia de aminoácidos que es diferente de la de la región Fc de partida. La región Fc de partida puede ser cualquier región Fc, siempre que una variante alterada de la región Fc de partida pueda unirse al receptor Fcγ humano en un intervalo de pH neutro. Además, una región Fc alterada a partir de una región Fc de partida que ya había sido alterada también puede usarse preferiblemente como una región Fc como se describe en este documento. La "región Fc de partida" puede referirse al polipéptido en sí mismo, a una composición que comprende la región Fc de partida o a una secuencia de aminoácidos que codifica la región Fc de partida. Las regiones Fc de partida pueden comprender una región Fc conocida producida mediante recombinación descrita brevemente en la sección "Anticuerpo". El origen de las regiones Fc de partida no está limitado y se pueden obtener de organismos humanos o no humanos. Dichos organismos incluyen preferiblemente ratones, ratas, cobayas, hámsteres, jerbos, gatos, conejos, perros, cabras, ovejas, bovinos, caballos, camellos y organismos seleccionados de primates no humanos. En otra realización, las regiones Fc de partida también se pueden obtener a partir de monos cynomolgus, títes, monos rhesus, chimpancés o seres humanos. Las regiones Fc de partida se pueden obtener preferiblemente a partir de IgG1 humana; sin embargo, no se limitan a ninguna clase de IgG en particular. Esto significa que una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas se puede usar apropiadamente como región Fc de partida, y en la presente también significa que una región Fc de una clase o subclase de IgG arbitraria derivada de cualquier organismo descrito anteriormente puede ser preferiblemente utilizado como región Fc de partida. Los ejemplos de variantes de IgG de origen natural o formas modificadas se describen en documentos publicados (Curr. Opin. Biotechnol. (2009), 20 (6): 685-91; Curr. Opin. Immunol. (2008), 20 (4): 460-470; Protein Eng. Des. Sel. (2010), 23 (4): 195-202; Publicaciones internacionales n.^{os} WO 2009/086320, WO 2008/092117, WO 2007/041635 y WO 2006/105338); sin embargo, no se limitan a los ejemplos.

Los ejemplos de alteraciones incluyen aquellas con una o más mutaciones, por ejemplo, mutaciones por sustitución de diferentes restos aminoácidos por aminoácidos de las regiones Fc de partida, por inserción de uno o más restos aminoácidos en las regiones Fc de partida, o por delección de uno o más aminoácidos de la región Fc de partida. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc alteradas comprenden al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de una región Fc no nativa. Tales variantes tienen necesariamente una identidad de secuencia o una similitud menor del 100 % con su región Fc de partida. En una realización preferida, las variantes tienen una identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % a menos de 100 %, más preferiblemente de aproximadamente 80 % a menos de 100 %, incluso más preferiblemente de aproximadamente 85 % a menos de 100 %, aún más preferiblemente aproximadamente 90 % a menos del 100 %, y aún más preferiblemente alrededor del 95 % a menos del 100 % de la secuencia de aminoácidos de su región Fc de partida. En una realización no limitante, al menos un aminoácido es diferente entre una región Fc con de unión a FcγR modificada como se describe en el presente documento y su región Fc de partida. Las diferencias de aminoácidos entre una región Fc con unión a FcγR modificada como se describe en este documento y su región Fc de partida también pueden especificarse adecuadamente basándose en las diferencias de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos particulares descritas anteriormente especificadas por el sistema de numeración EU.

La región Fc con unión a FcγR modificada, que tiene una actividad de unión al receptor Fcγ más alta que la de la región Fc de una IgG humana nativa en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa, contenida en las moléculas de unión a antígenos como se describe en este documento, puede obtenerse mediante cualquier método. Específicamente, la región Fc con unión a FcγR modificada se puede obtener alterando los aminoácidos en una inmunoglobulina de tipo IgG humana, y se usa como región Fc de partida. Las regiones Fc preferidas de inmunoglobulinas de tipo IgG para la alteración incluyen, por ejemplo, regiones Fc de IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y variantes de las mismas).

Los aminoácidos de cualquier posición se pueden alterar sustituyéndolos por otros aminoácidos, siempre que la actividad de unión hacia el receptor Fcγ sea mayor que la de la región Fc de una IgG humana nativa, en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa. Cuando

la molécula de unión a antígenos contiene una región Fc de IgG1 humana como región Fc humana, preferiblemente contiene una alteración que produce el efecto de una actividad de unión al receptor Fcγ más alta que la de la región Fc de una IgG humana nativa, en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa. Tales alteraciones de aminoácidos se han indicado, por ejemplo, en publicaciones internacionales como WO 2007/024249, WO 2007/021841, WO 2006/031370, WO 2000/042072, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO 2006/105338, WO 2007/041635, WO 2008/092117, WO 2005/070963, WO 2006/020114, WO 2006/116260 y WO 2006/023403.

Los ejemplos de tales aminoácidos que se pueden alterar incluyen al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de posiciones 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 250, 251, 254, 255, 256, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 311, 313, 315, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 376, 377, 378, 379, 380, 382, 385, 392, 396, 421, 427, 428, 429, 434, 436 y 440 (numeración EU). La alteración de estos aminoácidos puede producir regiones Fc (regiones Fc con unión a FcγR modificada) que tienen una actividad de unión al receptor Fcγ más alta que la actividad de unión al receptor Fcγ de una región Fc de una IgG humana nativa, en la que la cadena de azúcar unida en la posición 297 (numeración EU) es una cadena de azúcar que contiene fucosa.

Los ejemplos de alteraciones particularmente preferidas para su uso en la presente invención incluyen al menos una o más alteraciones de aminoácidos en la región Fc seleccionada del grupo de:

- 20 Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 221;
Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 222;
Phe, Trp, Glu o Lys para el aminoácido en la posición 223;
Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 224;
Glu, Lys o Trp para el aminoácido en la posición 225;
- 25 Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 227;
Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 228;
Ala, Glu, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 230;
Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 231;
Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 232;
- 30 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 233;
Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 234;
Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 235;
Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 236;
Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 237;
- 35 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 238;
Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 239;
Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 240;
Asp, Glu, Leu, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 241;
Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 243;
- 40 His para el aminoácido en la posición 244;
Ala para el aminoácido en la posición 245;
Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 246;
Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 247;
Glu, His, Gln o Tyr para el aminoácido en la posición 249;

- Glu o Gln para el aminoácido en la posición 250;
Phe para el aminoácido en la posición 251;
Phe, Met o Tyr para el aminoácido en la posición 254;
Glu, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 255;
- 5 Ala, Met o Pro para el aminoácido en la posición 256;
Asp, Glu, His, Ser o Tyr para el aminoácido en la posición 258;
Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 260;
Ala, Glu, Phe, Ile o Thr para el aminoácido en la posición 262;
Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 263;
- 10 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 264;
Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 265;
Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 266;
Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 267;
Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 268;
- 15 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 269;
Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 270;
Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 271;
Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 272;
Phe o Ile para el aminoácido en la posición 273;
- 20 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 274;
Leu o Trp para el aminoácido en la posición 275;
Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 276;
Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 278;
Ala para el aminoácido en la posición 279;
- 25 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 280;
Asp, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 281;
Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 282;
Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg o Tyr para el aminoácido en la posición 283;
Asp, Glu, Leu, Asn, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 284;
- 30 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 285;
Glu, Gly, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 286;
Asn, Asp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 288;
Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 290;
Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 291;
- 35 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 292;
Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 293;
Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 294;

- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 295;
 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 296;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 297;
 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 298;
- 5 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 299;
 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 300;
 Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 301;
 Ile para el aminoácido en la posición 302;
 Asp, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 303;
- 10 Asp, His, Leu, Asn o Thr para el aminoácido en la posición 304;
 Glu, Ile, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 305;
 Ala, Asp, Asn, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 311;
 Phe para el aminoácido en la posición 313;
 Leu para el aminoácido en la posición 315;
- 15 Glu o Gln para el aminoácido en la posición 317;
 His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 318;
 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 320;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 322;
 Ile para el aminoácido en la posición 323;
- 20 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 324;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 325;
 Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 326;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 327;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 328;
- 25 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 329;
 Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 330;
 Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 331;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 332;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 333;
- 30 Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 334;
 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 335;
 Glu, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 336;
 Glu, His o Asn para el aminoácido en la posición 337;
 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 339;
- 35 Ala o Val para el aminoácido en la posición 376;
 Gly o Lys para el aminoácido en la posición 377;
 Asp para el aminoácido en la posición 378;

Asn para el aminoácido en la posición 379;

Ala, Asn o Ser para el aminoácido en la posición 380;

Ala o Ile para el aminoácido en la posición 382;

Glu para el aminoácido en la posición 385;

5 Thr para el aminoácido en la posición 392;

Leu para el aminoácido en la posición 396;

Lys para el aminoácido en la posición 421;

Asn para el aminoácido en la posición 427;

Phe o Leu para el aminoácido en la posición 428;

10 Met para el aminoácido en la posición 429;

Trp para el aminoácido en la posición 434;

Ile para el aminoácido en la posición 436; y

Gly, His, Ile, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 440;

15 como lo indica la numeración EU. Por otra parte, el número de aminoácidos que se van a alterar no está en particular limitado, y un aminoácido en un solo sitio puede estar alterado o los aminoácidos en dos o más sitios pueden estar alterados. Los ejemplos de combinaciones para las alteraciones de aminoácidos en dos o más sitios incluyen los descritos en la tabla 6 (tablas 6-1 a 6-3).

20 Entre las regiones Fc adecuadas para su uso en la presente descripción, un ejemplo adecuado de una región Fc que tiene una actividad de unión más alta hacia un receptor Fcy inhibidor que hacia un receptor Fcy activador (es decir, que tiene una actividad de unión selectiva hacia un receptor Fcy inhibidor), que se usa como una realización no limitante de una región Fc con la propiedad de tener una actividad de unión más alta hacia un receptor Fcy específico que hacia otros receptores Fcy (es decir, una región Fc que tiene una actividad selectiva de unión al receptor Fcy), es una región Fc con una o más de las siguientes alteraciones en los aminoácidos (indicados por la numeración UE) de la región Fc antes mencionada: el aminoácido en la posición 238 se altera a Asp y el aminoácido en la posición 328 se modifica a Glu. Las regiones Fc y las alteraciones descritas en el documento US2009/0136485 puede seleccionarse apropiadamente como la región Fc que tiene una actividad de unión selectiva por un receptor Fcy inhibidor.

25 En una realización no limitante, un ejemplo adecuado es una región Fc en la que uno o más de los aminoácidos indicados por la numeración EU en las posiciones 238 y 328 según la numeración EU están respectivamente alterados a Asp o Glu en la región Fc antes mencionada.

30 Además, en una realización no limitante, los ejemplos adecuados de las regiones Fc son aquellas con sustitución de Asp por Pro en la posición 238 (numeración EU), y una o más alteraciones seleccionadas entre Trp para el aminoácido en la posición 237, Phe para el aminoácido en la posición 237, Val para el aminoácido en la posición 267, Gln para el aminoácido en la posición 267, Asn para el aminoácido en la posición 268, Gly para el aminoácido en la posición 271, Leu para el aminoácido en la posición 326, Gln para el aminoácido en la posición 326, Glu para el aminoácido en la posición 326, Met para el aminoácido en la posición 326, Asp para el aminoácido en la posición 239, Ala para el aminoácido en la posición 267, Trp para el aminoácido en la posición 234, Tyr para el aminoácido en la posición 234, Ala para el aminoácido en la posición 237, Asp para el aminoácido en la posición 237, Glu para el aminoácido en la posición 237, Leu para el aminoácido en la posición 237, Met para el aminoácido en la posición 237, Tyr para el aminoácido en la posición 237, Lys para el aminoácido en la posición 330, Arg para el aminoácido en la posición 330, Asp para el aminoácido en la posición 233, Asp para el aminoácido en la posición 268, Glu para el aminoácido en la posición 268, Asp para el aminoácido en la posición 326, Ser para el aminoácido en la posición 326, Thr para el aminoácido en la posición 326, Ile para el aminoácido en la posición 323, Leu para el aminoácido en la posición 323, Met para el aminoácido en la posición 323, Asp para el aminoácido en la posición 296, Ala para el aminoácido en la posición 326, Asn para el aminoácido en la posición 326 y Met para el aminoácido en la posición 330, según la numeración EU.

45 Se puede emplear de manera apropiada métodos conocidos, como la mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82, 488-492)) y la PCR de extensión por solapamiento, para alterar los aminoácidos de las regiones Fc. Además, también se pueden utilizar varios métodos conocidos como método de alteración de aminoácidos para sustituir aminoácidos por otros distintos de los aminoácidos naturales (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006), 35, 225-249; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003), 100 (11), 6353-6357). Por ejemplo, puede usarse de modo adecuado un sistema de traducción sin células (Clover Direct (Protein Express)) que contiene ARNt en el que el ARNt supresor ámbar, que es complementario con el codón UAG (codón ámbar) que es un codón de fin, se une

con un aminoácido no natural.

En una realización de variantes de la presente descripción, los polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígenos que tienen una cadena pesada en las que un polinucleótido que codifica una región Fc modificada para tener una mutación de aminoácidos como se describió anteriormente se unen dentro de marco a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígenos descrita anteriormente cuya actividad de unión varía dependiendo de una condición seleccionada.

La presente descripción proporciona métodos para producir moléculas de unión a antígenos, que comprenden recolectar las moléculas de unión a antígenos de medios de cultivo de células a las que se les ha introducido vectores en los que un polinucleótido que codifica una región Fc está operativamente unido dentro de marco a un polinucleótido que codifica un dominio de unión al antígeno cuyo la actividad de unión varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Además, la presente descripción también proporciona métodos para producir moléculas de unión a antígenos, que comprenden recolectar las moléculas de unión a antígenos de medios de cultivo de células a las que se les ha introducido vectores contruidos uniendo operativamente un polinucleótido que codifica un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión varía según la concentración de iones, a un polinucleótido que codifica una región Fc que está unida operativamente de antemano a un vector.

Composición farmacéutica

También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de unión a antígenos de la presente descripción, moléculas de unión a antígenos producidas mediante los métodos de alteración de la presente descripción o moléculas de unión a antígenos producidas mediante los métodos de producción descritos en este documento. Las moléculas de unión a antígenos como se describen en este documento o las moléculas de unión a antígenos producidas mediante los métodos de producción como se describe en este documento son útiles como composiciones farmacéuticas ya que, cuando se administran, tienen el fuerte efecto de reducir la concentración de antígenos en plasma en comparación con las moléculas de unión a antígenos típicas, y muestran la respuesta inmune *in vivo*, una farmacocinética y otras características mejoradas en animales a los que se les administran las moléculas. Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden comprender vehículos farmacéuticamente aceptables.

Como se usa en este documento, las composiciones farmacéuticas generalmente se refieren a agentes para tratar o prevenir, o para ensayar y diagnosticar enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden formular mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar por vía parenteral, en forma de inyecciones de disoluciones o suspensiones estériles que incluyen agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, tales composiciones se pueden formular mezclándolas en forma de una dosis unitaria requerida en la práctica de fabricación de medicamentos generalmente aprobada, combinándolas apropiadamente con vehículos o medios farmacológicamente aceptables, específicamente con agua estéril, disolución salina fisiológica, aceite vegetal, emulgente, suspensión, tensioactivo, estabilizante, agente aromatizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similar. En tales formulaciones, la cantidad de ingrediente activo se ajusta para obtener una cantidad apropiada en un intervalo predeterminado.

Las composiciones estériles para inyección se pueden formular usando vehículos, tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con la práctica de formulación convencional. Las disoluciones acuosas para inyección incluyen, por ejemplo, disoluciones salinas fisiológicas e isotónicas que contienen dextrosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). También es posible usar en combinación solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares), tensioactivos no iónicos (polisorbato 80(TM), HCO-50 y similares).

Los aceites incluyen aceite de sésamo y aceites de soja. Se pueden usar benzoato de bencilo y/o alcohol bencílico en combinación como solubilizantes. También es posible combinar tampones (por ejemplo, tampón fosfato y tampón acetato de sodio), agentes calmantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Las ampollas apropiadas se rellenan con las inyecciones preparadas.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran preferiblemente por vía parenteral. Por ejemplo, se administran las composiciones en una forma de dosificación para inyecciones, administración transnasal, administración transpulmonar o administración transdérmica. Por ejemplo, pueden administrarse sistémica o localmente mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares.

Los métodos de administración pueden seleccionarse de manera apropiada teniendo en cuenta la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene una molécula de unión a antígenos puede ser, por ejemplo, de 0,0001 mg a 1000 mg/kg para cada administración. Como alternativa, la dosis puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100000 mg por paciente. Sin embargo, la presente descripción no está limitada por los valores numéricos descritos anteriormente. Las dosis y los métodos de administración varían según el peso, la edad, los síntomas y demás del paciente. Los expertos en la técnica pueden establecer dosis y métodos de administración apropiados

teniendo en cuenta los factores descritos anteriormente.

Además, se proporcionan kits para su uso en los métodos descritos en este documento, que comprenden al menos una molécula de unión a antígenos como se describe en este documento. Además de lo anterior, los vehículos farmacéuticamente aceptables, los medios, los manuales de instrucciones que describen el método de uso y similares pueden envasarse en los kits.

Los aminoácidos contenidos en las secuencias de aminoácidos que se describen en el presente documento pueden modificarse postraduccionalmente (por ejemplo, los expertos en la técnica conocen bien la modificación de una glutamina N-terminal en un ácido piroglutámico mediante piroglutamilación). Naturalmente, tales aminoácidos modificados postraduccionalmente se incluyen en las secuencias de aminoácidos que se describen en el presente documento.

Método de selección y método de producción

En una realización, puede obtenerse una molécula de unión a antígenos que se une a un antígeno agregado y tiene la función de eliminar el antígeno agregado del plasma mediante la selección de moléculas de unión a antígeno, que comprende la siguiente etapa de:

(a) seleccionar una molécula de unión a antígenos cuya actividad de unión al antígeno a un antígeno agregado en una condición de concentración de iones intracelular es menor que la actividad de unión en una condición de concentración de iones extracelular.

En el método de selección descrito en este documento, la concentración de iones mencionada anteriormente se puede utilizar como concentración de iones. Para la condición de concentración de iones intracelular, por ejemplo, en el caso del calcio ionizado, es aplicable la condición de baja concentración de calcio descrita anteriormente; y en el caso de iones de hidrógeno o pH, es aplicable la alta concentración de iones de hidrógeno o el pH bajo descritos anteriormente, es decir, una condición de intervalo de pH ácido. Por otro lado, para la concentración de iones extracelular, por ejemplo, la condición de alta concentración de calcio descrita anteriormente es aplicable en el caso del calcio ionizado, y la concentración de iones de hidrógeno baja o pH alto descritos anteriormente, es decir, una condición de intervalo de pH neutro, es aplicable en el caso de ion hidrógeno o pH. Se puede confirmar que la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión a antígenos es menor en una condición de concentración de iones intracelular que en una condición de concentración de iones extracelular tomando medidas en cada una de las condiciones de concentración de iones de acuerdo con métodos de medición conocidos, como los descritos en la sección "Actividad de unión" descrita anteriormente.

El método de selección incluye un método que comprende además la etapa o etapas de:

(b):

(i) seleccionar una molécula de unión a antígenos cuya actividad de unión a un antígeno agregado es mayor que la actividad de unión a un antígeno no agregado en una condición de concentración de iones extracelular; y/o

(ii) seleccionar una molécula de unión a antígenos cuya actividad de unión a un receptor Fcγ o un FcRn de un complejo formado entre un antígeno agregado y una molécula de unión a antígenos es mayor que la actividad de unión a un receptor Fcγ o un FcRn de un complejo formado entre un antígeno no agregado y una molécula de unión a antígenos en una condición de concentración de iones extracelular.

La realización de esta etapa o etapas puede producir una molécula de unión a antígenos que tiene la función de eliminar los antígenos agregados con preferencia a los antígenos no agregados.

Puede confirmarse que una molécula de unión a antígenos muestra una mayor actividad de unión a un antígeno agregado que a un antígeno no agregado en una condición de concentración de iones extracelular midiendo su actividad de unión al antígeno agregado y al antígeno no agregado, respectivamente, en una condición de concentración de iones extracelular según los métodos descritos anteriormente para medir la actividad de unión a un receptor Fcγ o FcRn.

Además, "la actividad de unión de una molécula de unión a antígenos a un antígeno agregado es mayor que la actividad de unión a un antígeno no agregado en una condición de concentración de iones extracelular" puede reformularse como "la disociación de una molécula de unión a antígenos de un antígeno agregado es más lenta que la disociación de un antígeno no agregado en una condición de concentración de iones extracelular". Se puede confirmar que la disociación se está volviendo lenta, por ejemplo, mediante la comparación de las fases de disociación para el antígeno agregado y el antígeno no agregado, utilizando Biacore T200 (GE Healthcare) para obtener la pendiente de la fase de disociación cuando la condición se cambia de una condición de concentración de iones extracelular a una condición de concentración de iones intracelular. Un método específico es el descrito en el ejemplo 2(2).

En una de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, la molécula de unión a antígenos que se une a un antígeno agregado y que tiene la función de eliminar el antígeno agregado del plasma puede obtenerse mediante un método para producir una molécula de unión a antígenos que comprende, además de las anteriores etapa (a) o

etapas (a) y (b) descritas anteriormente, las siguientes etapas de:

(c) cultivar una célula hospedante que comprende un vector que porta un gen que codifica la molécula de unión a antígenos seleccionada en la etapa (a) o las etapas (a) y (b) mencionados anteriormente; y

(d) aislar una molécula de unión a antígenos del cultivo obtenido en la etapa (c) mencionada anteriormente.

- 5 Estas etapas se pueden llevar a cabo usando un método de producción de anticuerpos conocido, tal como se describe en la sección "Anticuerpo" mencionada anteriormente.

Todos los documentos de la técnica anterior citados en la memoria descriptiva se incorporan en la presente como referencia.

Tabla 7

LISTA DE ENFERMEDADES PERTINENTES	
NOMBRE DE LA ENFERMEDAD	PROTEÍNA CAUSAL
Enfermedad de Huntington	huntingtina
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	ataxina-1
Ataxia espinocerebelosa tipo 2	ataxina-2
Ataxia espinocerebelosa tipo 6	canal de Ca α 1A
Ataxia espinocerebelosa tipo 7	ataxina-7
Ataxia espinocerebelosa tipo 17	proteína de unión a TATA
Enfermedad de Machado-Joseph	MDJ
Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana	DRPLA
Atrofia muscular espinal y bulbar	receptor de andrógenos
Deficiencia de α 1-antitripsina	α 1-antitripsina
Enfisema	α 1-antiquimotripsina
Senilidad prematura	neuroserpina
Angioedema	inhibidor de C1
Trombos generalizados	antitrombina III
Enfermedad de Alzheimer	A β
Amiloidosis AL	L-ch
Polineuropatía familiar (FAP)	transtiretina
Amiloidosis AA reactiva	SAA
Amiloidosis de diálisis	β 2M
Amiloidosis AH	H-ch
Angiopatia amiloide cerebral	cistatina C
Enfermedad de Parkinson	α sinucleína
Demencia con cuerpos de Lewy	α sinucleína
Degeneración de múltiples sistemas	α sinucleína
Diabetes tipo 2	Amylin
Anemia falciforme	hemoglobina
Cataratas	cristalina
Nefropatía por IgA	IgA
Tauopatía	proteína tau
Degeneración lobar frontotemporal (FTLD)	proteína de unión al sitio TAR del ADN de 43 kDa (TDP-43)
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	proteína de unión al sitio TAR del ADN de 43 kDa (TDP-43),

LISTA DE ENFERMEDADES PERTINENTES	
NOMBRE DE LA ENFERMEDAD	PROTEÍNA CAUSAL
	superóxido dismutasa 1 (SOD1), FUS (condensado en el gen del sarcoma)
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob: ECJ	prion
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker: GSS	prion
Insomnio familiar letal: FFI	prion
Kuru	prion
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: CMT1A	prion
Síndrome de hipoventilación central congénita	PHOX2B
Epilepsia nutans ligada al cromosoma X	ARX
Distrofia muscular oculofaríngea	proteína de unión a poliadenilato nuclear 1 (PABPN1)
Distrofia muscular de cinturas (distal/Miyoshi)	disferlina
Miopatía por desmina	desmina
Leucodistrofias (enfermedad de Alexander)	GFAP
Epidermólisis ampollosa de Köbner (ictiosis)	queratina 5 /14

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos que muestran una unión dependiente del calcio a IgA humana

(1-1) Preparación de MRA-hIgA, GC-hIgA-FLAG y GC-hIgA-MYC

- 5 Como IgA humana, se prepararon MRA-hIgA (cadena pesada SEQ ID NO:33; cadena ligera SEQ ID NO:36), GC-hIgA-FLAG (cadena pesada SEQ ID NO:34; cadena ligera SEQ ID NO:37) y GC-hIgA-MYC (cadena pesada SEQ ID NO:35; cadena ligera SEQ ID NO:37) como sigue.

Preparación de MRA-hIgA

- 10 Se preparó MRA-hIgA que es un recombinante de IgA humana (en lo sucesivo, MRA-hIgA) como sigue. Un fragmento del gen que codifica MRA-hIgA (cadena pesada SEQ ID NO:33; cadena ligera SEQ ID NO:36) se insertó en un vector de expresión de células animales. El vector plasmídico construido se transfectó a FreeStyle 293 (Invitrogen) usando 293Fectin (Invitrogen) junto con un gen que expresa EBNA1. Luego, las células transfectadas se cultivaron a 37 °C bajo 8 % de CO₂ para secretar la proteína MRA-IgA hacia el sobrenadante del cultivo. La proteína se purificó usando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel de acuerdo con un método conocido por los expertos en la técnica.

Preparación de GC-hIgA-FLAG

- 20 Se preparó GC-hIgA-FLAG, que es un recombinante de IgA humana, (en lo sucesivo, GC-hIgA-FLAG) como sigue. Se insertó un fragmento del gen que codifica GC-hIgA-FLAG (cadena pesada SEQ ID NO:34; cadena ligera SEQ ID NO:37) en un vector de expresión de células animales. El vector plasmídico construido se transfectó a FreeStyle 293 (Invitrogen) usando 293Fectin (Invitrogen) junto con un gen que expresa EBNA1. Luego, las células transfectadas se cultivaron a 37°C bajo 8 % de CO₂ durante seis días para secretar la proteína GC-hIgA hacia el sobrenadante del cultivo.

El cultivo celular que contenía GC-hIgA-FLAG se filtró a través de un filtro en la parte superior de una botella de 0,22 µm para obtener el sobrenadante del cultivo. Se obtuvo GC-hIgA-FLAG purificada usando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel de acuerdo con un método conocido por los expertos en la técnica.

- 25 Preparación de GC-hIgA-MYC

Se preparó GC-hIgA-MYC, que es un recombinante de IgA humana, (en adelante, GC-hIgA-MYC) como sigue. Se insertó un fragmento del gen que codifica GC-hIgA-MYC (cadena pesada SEQ ID NO:35; cadena ligera SEQ ID NO:37) en un vector de expresión de células animales. El vector plasmídico construido se transfectó a FreeStyle 293

(Invitrogen) usando 293Fectin (Invitrogen) junto con un gen que expresa EBNA1. Luego, las células transfectadas se cultivaron a 37 °C bajo 8 % de CO₂ durante seis días para secretar la proteína GC-hIgA hacia el sobrenadante del cultivo.

El cultivo celular que contenía GC-hIgA-MYC se filtró a través de un filtro en la parte superior de una botella de 0,22 µm para obtener el sobrenadante del cultivo. Se obtuvo GC-hIgA-MYC purificada usando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel de acuerdo con un método conocido por los expertos en la técnica.

(1-2) Anticuerpos con unión dependiente de calcio

H54/L28-IgG1 descrito en la publicación internacional n.º WO 2009/125825 es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado. Fv4-IgG1 es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado que resulta de conferir a H54/L28-IgG1 la propiedad de unirse al receptor de IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH (es decir, de unión en condiciones neutras y disociación en condiciones ácidas). El ensayo *in vivo* descrito en la Publicación Internacional n.º WO 2009/125825 usando ratones demostró que la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble se acelera enormemente en un grupo al que se administra una mezcla de Fv4-IgG1 y receptor de IL-6 humano soluble como antígeno, en comparación con un grupo al que se administra una mezcla de H54/L28-IgG1 y receptor de IL-6 humano soluble como antígeno.

El receptor de IL-6 humano soluble unido a un anticuerpo general que se une al receptor de IL-6 humano soluble se recicla hacia el plasma junto con el anticuerpo a través de FcRn. Por otra parte, un anticuerpo que se une al receptor de IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH se disocia en las condiciones ácidas en el endosoma del receptor de IL-6 humano soluble que estaba unido al anticuerpo. El receptor de IL-6 humano soluble disociado se degrada en el lisosoma. Por tanto, esto puede acelerar enormemente la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble. Además, el anticuerpo que se une al receptor de IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH se recicla hacia el plasma a través de FcRn, de modo que el anticuerpo reciclado puede unirse de nuevo a un receptor de IL-6 humano soluble. Repitiendo esto, una sola molécula de anticuerpo puede unirse repetidamente a los receptores de IL-6 humana soluble varias veces (figura 1).

Por otra parte, como se describe en la Publicación Internacional n.º WO 2009/125825, H54/L28-IgG1 es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado y Fv4-IgG1 es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado que resulta de conferir a H54/L28-IgG1 la propiedad de unirse al receptor de IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH (es decir, unión en condiciones neutras y disociación en condiciones ácidas). Fv4-IgG1-v2 es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado en el que la unión a FcRn aumenta frente a Fv4-IgG1 en condiciones neutras. Los ensayos *in vivo* descritos en la Publicación Internacional n.º WO 2011/122011 que emplean ratones demostraron que la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble se acelera en gran medida en un grupo al que se administra una mezcla de Fv4-IgG1-v2 y receptor de IL-6 humano soluble como antígeno, en comparación con un grupo al que se administra una mezcla de Fv4-IgG1 y receptor de IL-6 humano soluble como antígeno. Por lo tanto, se indicó que, al mejorar la unión hacia FcRn en condiciones neutras (pH 7,4) de un anticuerpo que se une a antígenos de una manera dependiente del pH, el efecto del anticuerpo de unirse repetidamente a los antígenos y el efecto de estimular la eliminación de los antígenos del plasma puede mejorarse aún más, y la eliminación de antígenos puede eliminarse del plasma mediante la administración del anticuerpo (figura 2).

En el mecanismo de un anticuerpo de unión dependiente del pH mostrado en las figuras 1 y 2, es importante que el anticuerpo se una fuertemente a un antígeno en el plasma y se disocie del antígeno en el endosoma basándose en la diferencia ambiental entre el plasma y el endosoma, es decir, la diferencia de pH (pH 7,4 en plasma; pH 6,0 en endosoma). El grado de diferencia ambiental entre el plasma y el endosoma es importante para diferenciar la capacidad de unión al antígeno de un anticuerpo de unión dependiente del pH en el plasma y en el endosoma. Una diferencia de pH se debe a una diferencia en la concentración de iones de hidrógeno. Específicamente, la concentración de iones de hidrógeno en el plasma (pH 7,4) es de aproximadamente 40 nM, mientras que la concentración en el endosoma (pH 6,0) es de aproximadamente 1000 nM. La concentración del factor (ion hidrógeno) difiere en aproximadamente 25 veces entre el plasma y el endosoma.

Los presentes inventores concibieron que, con el fin de lograr fácilmente el mecanismo ilustrado en las figuras 1 y 2 o para mejorar el mecanismo, sería beneficioso utilizar un anticuerpo que dependa de un factor que tenga una mayor diferencia de concentración entre el plasma y el endosoma que la diferencia de concentración de iones de hidrógeno entre los dos. Por tanto, los inventores buscaron un factor cuya concentración sea considerablemente diferente entre el plasma y el endosoma. Como resultado, se identificó el calcio. La concentración del calcio ionizado es de aproximadamente 1,1 a 1,3 mM en plasma y de aproximadamente 3 µM en el endosoma. La concentración del factor (calcio) difiere unas 400 veces entre los dos. Por lo tanto, se descubrió que la proporción era mayor que la diferencia en la concentración de iones hidrógeno (25 veces). Específicamente, se espera que la disociación del antígeno de un anticuerpo que sea equivalente a la de un anticuerpo de unión dependiente del pH, o más eficiente que con este, se logre mediante el uso de un anticuerpo de unión dependiente de la concentración del calcio ionizado, que se une a un antígeno en una condición de alta concentración de calcio (1,1 a 1,3 mM), pero se disocia del antígeno en condiciones de baja concentración de calcio (3 µM).

(1-3) Expresión y purificación de anticuerpos que se unen a IgA humana

GA2-IgG1 (cadena pesada SEQ ID NO:38; cadena ligera SEQ ID NO:39) es un anticuerpo recién obtenido que se une a la IgA humana. La secuencia de ADN que codifica GA2-IgG1 (cadena pesada SEQ ID NO:38; cadena ligera SEQ ID NO:39) se insertó en plásmidos de expresión de células animales mediante un método conocido por los expertos en la técnica. Los anticuerpos se expresaron mediante el siguiente método. Se suspendieron células FreeStyle 293-F (Invitrogen) derivadas de células de riñón fetal humano en el medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) y se sembraron en placas a una densidad celular de $1,33 \times 10^6$ células/ml (3 ml) en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Los plásmidos construidos se transfectaron en células mediante un método de lipofección. Las células se cultivaron durante cinco días en un incubador de CO₂ (37 °C, 8 % de CO₂, 90 rpm). A partir de los sobrenadantes de cultivo preparados, se purificaron los anticuerpos usando rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) mediante un método conocido por los expertos en la técnica. Las concentraciones de anticuerpos purificados se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro. Las concentraciones de anticuerpos se calcularon a partir de los valores determinados utilizando un coeficiente de extinción calculado por el método PACE (Protein Science (1995), 4: 2411-2423).

(1-4) Evaluación de anticuerpos preparados para la actividad de unión a IgA humana dependiente del calcio

Utilizando Biacore T200 (GE Healthcare), se evaluó la actividad de unión de los anticuerpos obtenidos a IgA humana (constante de disociación K_D (M)). La medición se llevó a cabo utilizando, como tampón de tránsito, Tween20 al 0,05 %, ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l (pH 7,4 o pH 5,8) que contenía CaCl₂ 3 µM o 1,2 mM, o Tween20 al 0,05 %, ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l (pH 8,0) que contenía CaCl₂ 0,1 µM o 10 mM.

Después de inmovilizar una cantidad adecuada de proteína A/G recombinante (Thermo Scientific) sobre el chip detector CM5 (GE Healthcare) mediante un método de acoplamiento de amino, se permitió que los anticuerpos se unieran al chip detector. Se inyectó una concentración apropiada de MRA-hIgA (descrita en (1-1)) como analito para interactuar con los anticuerpos sobre el chip detector. Luego, se regeneró el chip detector inyectando 10 mmol/l de glicina-HCl, pH 1,5. La medición se realizó a 37 °C. A partir del resultado del ensayo, la constante de disociación K_D (M) se calculó basándose en un análisis de ajuste de la curva y un análisis de la constante de equilibrio utilizando el software de evaluación Biacore T200 (GE Healthcare). El resultado se muestra en la tabla 8. Se descubrió que GA2-IgG1 se unía fuertemente a la IgA humana a una concentración de Ca²⁺ de 1,2 mM, mientras que el anticuerpo se unía débilmente a la IgA humana en una concentración de Ca²⁺ de 3 µM. Además, por debajo de una condición de concentración de Ca²⁺ 1,2 mM, se demostró que GA2-IgG1 se unía fuertemente a la IgA humana a pH 7,4, pero débilmente a pH 5,8. Más específicamente, se descubrió que GA2-IgG1 se unía a la IgA humana de una manera dependiente del pH y del calcio.

Tabla 8

Nombre del anticuerpo	Condiciones	Ajuste	ka	kd	KD [M]
GA2-IgG1	pH 7,4, Ca 1,2 mM	Modelo de unión 1:1	4,0E + 05	1,6E-02	3,9E-08
	pH 7,4, Ca 3 µM	Afinidad de estado estacionario	-	-	6,7E-06
	pH 5,8, Ca 1,2 mM	Afinidad de estado estacionario	-	-	4,0E-06
	pH 5,8, Ca 3 µM	Afinidad de estado estacionario	-	-	5,0E-06

Ejemplo 2

(2-1) Preparación de hIgA agregada

La hIgA agregada se preparó utilizando el agente de entrecruzamiento SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo, Thermo Scientific). La GC-hIgA-MYC preparada en el ejemplo 1 se modificó usando SPDP y las hIgA se entrecruzaron entre sí mezclando una fracción que no se había tratado posteriormente, con una fracción que se había tratado en condiciones reductoras. Después de la reacción de entrecruzamiento, el componente macromolecular se fraccionó mediante cromatografía de filtración en gel para obtener la hIgA agregada. El resultado del análisis cromatográfico de filtración en gel sobre la hIgA agregada se muestra en la figura 3. El peso molecular aparente de la hIgA agregada, calculado a partir de la posición de elución del marcador de peso molecular, fue de 780 kDa. Dado que el pico de elución es ancho, es posible que se esuviesen formando agregados de varios tamaños. Como comparación, se utilizó GC-hIgA-FLAG que no se había sido tratado con SPDP como hIgA no agregada.

(2-2) Evaluación de los anticuerpos obtenidos para determinar su capacidad de unión dependiente de pH/Ca a hIgA agregada

Los anticuerpos obtenidos se evaluaron para determinar su unión a hIgA no agregada e hIgA agregada usando Biacore T200 (GE Healthcare). La medición se llevó a cabo utilizando, como tampón de tránsito, Tween20 al 0,05 %, ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l (pH 7,4 y pH 5,8) que contenía CaCl₂ 3 µM o 1,2 mM.

Después de inmovilizar una cantidad adecuada de proteína A/G recombinante (Thermo Scientific) sobre el chip detector CM5 (GE Healthcare) mediante un método de acoplamiento de amino, se permitió que los anticuerpos se unieran al chip detector. Se inyectó una concentración apropiada de hlgA (descrita en el ejemplo 1) como analito para interactuar con los anticuerpos sobre el chip detector. Luego, el chip detector se regeneró inyectando 10 mmol/l de glicina-HCl, pH 1,5. La medición se realizó a 37 °C. El sensograma obtenido se muestra en la figura 4.

Se demostró claramente que la unión de GA2-IgG1 a hlgA no agregada era fuerte a una concentración de Ca^{2+} de 1,2 mM, pero débil a una concentración de Ca^{2+} de 3 μM . La comparación de los resultados de hlgA no agregada y hlgA agregada mostró que la pendiente de la fase de disociación se estaba volviendo más llana para la hlgA agregada, y la disociación de GA2-IgG1 se estaba volviendo difícil. La razón de este retraso de la disociación puede deberse a que una sola molécula de hlgA agregada contiene múltiples sitios de unión y GA2-IgG1 se une a la molécula con avidez.

Ejemplo 3: Evaluación de anticuerpos de unión a IgA humana para determinar su efecto sobre la retención plasmática de hlgA agregada e hlgA no agregada usando ratones normales

(3-1) Ensayo *in vivo* con ratones normales

Se administró a ratones normales (ratones C57BL/6J; Charles River Japan) hlgA no agregada (preparada en el ejemplo 1) o hlgA agregada (preparada en el ejemplo 2) sola o administrada con un anticuerpo anti-hlgA un día antes de la administración de hlgA no agregada o hlgA agregada; y luego fueron evaluados para la dinámica *in vivo* de hlgA y el anticuerpo anti-hlgA. Se administraron un anticuerpo anti-hlgA, una disolución de hlgA no agregada (300 $\mu\text{g/ml}$) y una disolución de hlgA agregada (300 $\mu\text{g/ml}$) a 10 ml/kg en la vena caudal. El anticuerpo anti-hlgA usado fue GA2-IgG1 descrito anteriormente.

La concentración de IgA humana fue de 300 $\mu\text{g/mL}$ en todas las disoluciones mezcladas. Por otra parte, la concentración de anticuerpo anti-hlgA fue de 30 $\mu\text{g/ml}$ (0,3 mg / kg), 100 $\mu\text{g/ml}$ (1 mg / kg) o 300 $\mu\text{g/ml}$ (3 mg / kg). Cuando la concentración de anticuerpo anti-hlgA era de 30 $\mu\text{g/ml}$ o 100 $\mu\text{g/ml}$, la hlgA estaba presente en exceso con respecto al anticuerpo anti-hlgA y, por lo tanto, se asumió que la mayoría del anticuerpo anti-hlgA estaba unido a hlgA. Por el contrario, más de la mitad de hlgA no se unió al anticuerpo. Por otra parte, cuando la concentración de anticuerpo anti-hlgA era de 300 $\mu\text{g/ml}$, el anticuerpo anti-hlgA y la hlgA estaban presentes en cantidades casi iguales; y cuando se tuvo en cuenta la afinidad de GA2-IgG1, se pensó que estaban unidos aproximadamente 80 % del anticuerpo anti-hlgA y de la hlgA.

La sangre se recogió 5 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 7 horas, 1 día, 2 días y 3 días después de la administración. Inmediatamente después de la recolección, la sangre se centrifugó a 4 °C y 12000 rpm durante 15 minutos para aislar el plasma. El plasma aislado se almacenó en un congelador a -20 °C o menos antes de las mediciones.

(3-2) Determinación de la concentración en plasma de anticuerpo anti-IgA humana en ratones normales mediante ELISA

Las concentraciones de anticuerpos anti-IgA humana en plasma de ratón se determinaron mediante ELISA. En primer lugar, se dividió en partes alícuotas el fragmento de anticuerpo F(ab')₂ anti-IgG humana (específico de la cadena γ) (SIGMA) en Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International). La placa se dejó durante la noche a 4 °C para preparar una placa inmovilizada con anticuerpo anti-IgG humana. Se prepararon muestras patrón a concentraciones plasmáticas de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,03125 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras de ensayo de plasma de ratón se prepararon diluyendo en 100 veces o más. Las muestras se dividieron en partes alícuotas en la placa inmovilizada con anticuerpo anti-IgG humana. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, las muestras se hicieron reaccionar con el conjugado de biotina (BIOT) anti-IgG humana (específica de la cadena γ) de cabra (Southern Biotechnology Associates Inc.) a temperatura ambiente durante una hora. Luego, las muestras se hicieron reaccionar con estreptavidina-poliHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) a temperatura ambiente durante una hora. La reacción cromogénica se llevó a cabo utilizando el sustrato de micropocillos de HRP de un componente TMB (BioFX Laboratories) como sustrato. Una vez terminada la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas. Usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices), se calcularon las concentraciones plasmáticas de ratón basándose en la absorbancia de la curva patrón. En la figura 5 se muestra el desarrollo en el tiempo de las concentraciones plasmáticas de anticuerpo GA2-IgG1 determinadas por el método descrito anteriormente después de la administración intravenosa a ratones normales.

(3-3) Determinación de la concentración en plasma de IgA humana mediante ELISA

La concentración de IgA humana no agregada (IgA humana monomérica) en plasma de ratón se determinó mediante ELISA. En primer lugar, se dispuso el anticuerpo anti-FLAG de ratón (SIGMA) en las placas Nunc-Immuno, MaxiSorp (Nalge Nunc International), y se dejó reposar durante la noche a 4 °C para preparar placas inmovilizadas con anti-FLAG. Se prepararon muestras de la curva de calibración de IgA humana de concentraciones plasmáticas de 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0,3125 $\mu\text{g/ml}$, y muestras de ensayo de plasma de ratón diluidas en 100 veces o más y se dividieron en partes alícuotas en las placas inmovilizadas con anti-FLAG. Las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μl de GPC3 500 ng/ml (R&D Systems) y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. Se añadieron 100 μl de anticuerpo anti-GPC3 biotinilado 1 $\mu\text{g/ml}$ y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante una hora, y luego con estreptavidina-poliHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) a temperatura ambiente durante una hora. La reacción cromogénica se llevó a cabo utilizando el

sustrato de micropocillos HRP de un componente TMB (BioFX Laboratories) como sustrato. Una vez terminada la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas. Usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices), se calcularon las concentraciones en plasma de ratón basándose en la absorbancia de la curva patrón.

- 5 La concentración de IgA humana-SPDP-polímero (IgA humana agregada) en plasma de ratón se midió mediante el método ECL. En primer lugar, se dispensó un anticuerpo anti-c-MYC de ratón (SIGMA) en la placa de 96 pocillos MULTI-ARRAY (MSD) y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente para preparar placas inmovilizadas con anti-MYC. Se prepararon muestras de la curva de calibración de IgA humana-SPDP-polímero con concentraciones plasmáticas de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 y 0,1563 µg/ml, y muestras de ensayo de plasma de ratón diluidas en 100 veces o más. Antes se prepararon muestras de ensayo de plasma de ratón y plasma diluido en 50 veces que contenía STD usando un tampón que contenía EDTA 10 mM, y luego esto se mezcló con una cantidad igual de 20 µg/mL de anticuerpo para ser administrado (en tampón EDTA 10 mM) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos para preparar las muestras para agregarlas a las placas. Estas muestras se dividieron en partes alícuotas en la placa inmovilizada con anti-MYC y luego se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se agregaron 100 µL de anticuerpo anti-IgA humana de conejo biotinilado (BETHYL) 1 µg/mL y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante una hora, y esto se hizo reaccionar con estreptavidina-poliHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, después de la adición de Read Buffer, se tomaron las mediciones en un Sector Imager 2400 (MSD). La concentración en plasma de ratón se calculó en base a la respuesta en la curva de calibración utilizando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices).
- 20 En las figuras 6 y 7, respectivamente, se muestra el desarrollo en el tiempo de la concentración de IgA humana (IgA humana no agregada (IgA humana monomérica)) y la concentración de IgA humana-SPDP-polímero (IgA humana agregada) en plasma de ratón normal después de la administración intravenosa, que se midieron mediante este método, y en la tabla 9 se muestra sus valores de eliminación y similares.

Tabla 9

IgA humana	Dosis de GA2-IgG1 (mg/kg)	Eliminación de IgA humana (ml/día/kg)	Proporción de eliminación CL (IgA humana + GA2-IgG1)/CL (IgA humana sola)	Proporción de eliminación (IgA humana agregada)/tasa de eliminación (IgA humana monomérica)
IgA humana monomérica	-	80,6 ± 5,2	-	-
	0,3	85,5 ± 20,6	1,1	-
	1,0	98,5 ± 5,3	1,2	-
	3,0	128 ± 6	1,6	-
IgA humana agregada	-	307 ± 19	-	-
	0,3	557 ± 42	1,8	1,7
	1,0	1599 ± 359	5,2	4
	3,0	4967 ± 411	16,2	10,2

- 25 El desarrollo en el tiempo de la "concentración de IgA humana no agregada después de la administración de GA2-IgG1/concentración de IgA humana no agregada cuando se administra IgA humana sola" y "concentración de IgA humana agregada después de la administración de GA2-IgG1/concentración de IgA humana agregada cuando se administra IgA humana sola" se muestran en la figura 8 como indicadores que presentan el grado en el que se aceleró la eliminación de ambos tipos de IgA humana debido a la administración de GA2-IgG1 en comparación con la administración de IgA humana monomérica (IgA humana no agregada) sola o IgA humana agregada sola.
- 30

Estos resultados muestran que a cualquier dosis, GA2-IgG1 acelera la eliminación de IgA humana agregada con preferencia a la IgA humana no agregada. En particular, con GA2-IgG1 a 3 mg/kg, la eliminación de la IgA humana agregada podría acelerarse preferentemente en diez o más veces en términos de proporción de eliminación.

35 Análisis

- Como resultado, mientras que la eliminación de la IgA humana no agregada fue solo ligeramente más rápida cuando se coadministró con GA2-IgG1 que cuando se administró sola, la eliminación de la IgA humana agregada se aceleró enormemente cuando se coadministró con GA2-IgG1 en comparación con cuando se administró sola. Mientras que la proporción de eliminación de la IgA humana no agregada entre la administración única y la coadministración con un anticuerpo es de 1,1 a 1,6, la proporción de eliminación de la IgA humana agregada entre la administración única y la coadministración con un anticuerpo es de 1,8 a 16,2. Esto muestra que el grado de aceleración de la eliminación es mayor para la IgA humana agregada que para la IgA humana no agregada cuando se coadministra con un anticuerpo.
- 40

En cuanto a la farmacocinética de GA2-IgG1, también cuando se coadministró con IgA humana no agregada o IgA

humana agregada, la eliminación fue lenta un día después de la administración y en adelante.

El siguiente mecanismo puede ser la razón por la que la eliminación de la IgA humana agregada se aceleró en gran medida en comparación con la eliminación de IgA humana no agregada.

Dado que un antígeno agregado contiene múltiples sitios de unión a anticuerpos en una sola molécula, múltiples moléculas de anticuerpos se unen polivalente y fuertemente; además, apenas se disocia en comparación con el antígeno monomérico no agregado, y forma enormes complejos inmunes. Como se muestra en la figura 9, dado que enormes complejos inmunes que contienen múltiples moléculas de anticuerpos pueden unirse polivalente y fuertemente a los receptores de la superficie celular (FcγR, FcRn, receptores del complemento, etc.) a través de una región Fc polivalente, son absorbidos eficazmente por las células que expresan estos receptores. Luego, la disociación del antígeno agregado del anticuerpo que muestra una unión dependiente de pH o Ca disuelve la formación de complejos inmunes en el endosoma. Dado que el antígeno agregado no puede unirse a FcRn, se transfiere a un lisosoma y luego se degrada. Por otra parte, dado que el anticuerpo no puede formar un complejo inmunológico, se cree que el FcRn lo recicla hacia el plasma. Por el contrario, dado que los pequeños complejos inmunes que no contienen múltiples anticuerpos no tienen suficiente afinidad por los receptores de tipo IgG1 naturales, como se muestra en la figura 10, su incorporación hacia el interior de las células es de baja eficacia o tiene lugar solo de forma no específica.

Como se muestra en la figura 4, cuando se permite que GA2-IgG1 interactúe con IgA humana agregada, la fase de disociación se vuelve más llana; y en comparación con la disociación de la IgA humana no agregada, GA2-IgG1 tiene la propiedad de no disociarse fácilmente de la IgA humana agregada. Más específicamente, dado que múltiples moléculas de GA2-IgG1 se unen multivalentemente a una IgA humana agregada y la disociación es difícil, pueden formar un complejo inmune más grande que el complejo inmune formado entre la IgA humana no agregada y GA2-IgG1. Dado que los enormes complejos inmunes se unen fuertemente a través de regiones Fc multivalentes a FcγR, FcRn, receptores del complemento o similares, se cree que las células que expresan estos receptores los captan rápidamente, y luego la IgA humana agregada se disocia de GA2-IgG1 en el endosoma y se transfiere al lisosoma y es degradado y, por tanto, la eliminación se acelera sustancialmente en comparación con cuando se administró IgA humana sola. Además, se considera que GA2-IgG1 es reciclado hacia el plasma por FcRn después de la disociación de la IgA humana agregada y la disolución del complejo inmune.

Más específicamente, GA2-IgG1 puede haber logrado una aceleración sustancial de la eliminación de IgA humana agregada por dos efectos de unión multivalente: formando un enorme complejo inmune al unirse fuerte y multivalentemente a IgA humana agregada más que a IgA humana no agregada, y uniéndose fuerte y multivalentemente a varios receptores de Fc a través de múltiples Fc.

Así, se demostró que GA2-IgG1 tiene el efecto de eliminar la IgA humana agregada del plasma con preferencia a la IgA humana no agregada.

Por lo tanto, la eliminación de antígenos agregados puede acelerarse preferentemente en la copresencia de antígenos agregados y no agregados, al conferir a una molécula de unión a antígenos que se une a antígenos agregados y que comprende una región Fc, la función de tener una actividad de unión dependiente del pH y/o la concentración de Ca. Además, puede ser posible aumentar la preferencia por los antígenos agregados y acelerar la eliminación de los antígenos agregados si se puede seleccionar un anticuerpo apropiado dependiente de pH y Ca que se una a los antígenos agregados con más fuerza que a los antígenos no agregados.

Las moléculas de unión a antígenos que tienen el efecto de eliminar antígenos agregados con preferencia a los antígenos no agregados del plasma de esta manera pueden aplicarse como agentes terapéuticos para enfermedades causadas por agregados, tales como amiloidosis, enfermedad por poliglutaminas, enfermedad de serpinas, nefropatía por IgA y similares.

Lista de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Molécula de unión a antígenos para eliminar antígenos agregados.

<130> C1-A1205P

<150> JP 2012-123782

<151> 30-15-2012

<160> 39

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 856 272 T3

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

5 <210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 2

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 3

ES 2 856 272 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

10

Asn Gly Asp Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Val
85 90 95

Leu Arg Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Gln
100 105 110

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 5

ES 2 856 272 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Val Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Trp Ala Ser Ile Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asp Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Arg Ala Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105 110

10 <210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 856 272 T3

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 8

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 9

<211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 9
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

ES 2 856 272 T3

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 10
<211> 326
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 10
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

10

ES 2 856 272 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 11

<211> 377

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

ES 2 856 272 T3

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln

ES 2 856 272 T3

260

265

270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 12

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

10

ES 2 856 272 T3

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 13

<211> 365

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 856 272 T3

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30
 His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
 35 40 45
 Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60
 Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
 85 90 95
 Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
 100 105 110
 Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
 115 120 125
 Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
 130 135 140
 Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
 145 150 155 160
 Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
 165 170 175
 Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
 180 185 190
 Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205
 Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
 210 215 220
 Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu

ES 2 856 272 T3

225 230 235 240
 Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
 260 265 270
 Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
 275 280 285
 Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
 290 295 300
 Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
 325 330 335
 Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
 340 345 350
 Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
 355 360 365
 <210> 14
 <211> 119
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30
 His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
 35 40 45
 Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50 55 60
 Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
 85 90 95
 Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
 100 105 110
 Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115

<210> 15
 <211> 1125
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1125)

<400> 15
 atg tgg ttc ttg aca act ctg ctc ctt tgg gtt cca gtt gat ggg caa 48
 Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
 1 5 10 15

gtg gac acc aca aag gca gtg atc act ttg cag cct cca tgg gtc agc 96
 Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
 20 25 30

gtg ttc caa gag gaa acc gta acc ttg cac tgt gag gtg ctc cat ctg 144
 Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
 35 40 45

cct ggg agc agc tct aca cag tgg ttt ctc aat ggc aca gcc act cag 192
 Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
 50 55 60

acc tcg acc ccc agc tac aga atc acc tct gcc agt gtc aat gac agt 240
 Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
 65 70 75 80

ggt gaa tac agg tgc cag aga ggt ctc tca ggg cga agt gac ccc ata 288
 Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
 85 90 95

cag ctg gaa atc cac aga ggc tgg cta cta ctg cag gtc tcc agc aga 336
 Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
 100 105 110

gtc ttc acg gaa gga gaa cct ctg gcc ttg agg tgt cat gcg tgg aag 384
 Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
 115 120 125

gat aag ctg gtg tac aat gtg ctt tac tat cga aat ggc aaa gcc ttt 432
 Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
 130 135 140

aag ttt ttc cac tgg aat tct aac ctc acc att ctg aaa acc aac ata 480
 Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
 145 150 155 160

agt cac aat ggc acc tac cat tgc tca ggc atg gga aag cat cgc tac 528

10

ES 2 856 272 T3

Ser	His	Asn	Gly	Thr	Tyr	His	Cys	Ser	Gly	Met	Gly	Lys	His	Arg	Tyr		
				165					170					175			
aca	tca	gca	gga	ata	tct	gtc	act	gtg	aaa	gag	cta	ttt	cca	gct	cca		576
Thr	Ser	Ala	Gly	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	Pro	Ala	Pro		
			180					185					190				
gtg	ctg	aat	gca	tct	gtg	aca	tcc	cca	ctc	ctg	gag	ggg	aat	ctg	gtc		624
Val	Leu	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Glu	Gly	Asn	Leu	Val		
		195					200					205					
acc	ctg	agc	tgt	gaa	aca	aag	ttg	ctc	ttg	cag	agg	cct	ggt	ttg	cag		672
Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Gln		
	210					215				220							
ctt	tac	ttc	tcc	ttc	tac	atg	ggc	agc	aag	acc	ctg	cga	ggc	agg	aac		720
Leu	Tyr	Phe	Ser	Phe	Tyr	Met	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Arg	Gly	Arg	Asn		
225					230					235					240		
aca	tcc	tct	gaa	tac	caa	ata	cta	act	gct	aga	aga	gaa	gac	tct	ggg		768
Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Thr	Ala	Arg	Arg	Glu	Asp	Ser	Gly		
				245					250					255			
tta	tac	tgg	tgc	gag	gct	gcc	aca	gag	gat	gga	aat	gtc	ctt	aag	cgc		816
Leu	Tyr	Trp	Cys	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Asp	Gly	Asn	Val	Leu	Lys	Arg		
			260					265					270				
agc	cct	gag	ttg	gag	ctt	caa	gtg	ctt	ggc	ctc	cag	tta	cca	act	cct		864
Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Thr	Pro		
		275					280					285					
gtc	tgg	ttt	cat	gtc	ctt	ttc	tat	ctg	gca	gtg	gga	ata	atg	ttt	tta		912
Val	Trp	Phe	His	Val	Leu	Phe	Tyr	Leu	Ala	Val	Gly	Ile	Met	Phe	Leu		
	290					295					300						
gtg	aac	act	gtt	ctc	tgg	gtg	aca	ata	cgt	aaa	gaa	ctg	aaa	aga	aag		960
Val	Asn	Thr	Val	Leu	Trp	Val	Thr	Ile	Arg	Lys	Glu	Leu	Lys	Arg	Lys		
305					310					315					320		
aaa	aag	tgg	gat	tta	gaa	atc	tct	ttg	gat	tct	ggt	cat	gag	aag	aag		1008
Lys	Lys	Trp	Asp	Leu	Glu	Ile	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	His	Glu	Lys	Lys		
				325					330					335			
gta	att	tcc	agc	ctt	caa	gaa	gac	aga	cat	tta	gaa	gaa	gag	ctg	aaa		1056
Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Glu	Asp	Arg	His	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys		
			340					345					350				
tgt	cag	gaa	caa	aaa	gaa	gaa	cag	ctg	cag	gaa	ggg	gtg	cac	cgg	aag		1104
Cys	Gln	Glu	Gln	Lys	Glu	Glu	Gln	Leu	Gln	Glu	Gly	Val	His	Arg	Lys		
		355					360					365					
gag	ccc	cag	ggg	gcc	acg	tag											1125
Glu	Pro	Gln	Gly	Ala	Thr												
			370														

<210> 16

<211> 374

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 856 272 T3

Met	Trp	Phe	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Val	Asp	Gly	Gln	1	5	10	15
Val	Asp	Thr	Thr	Lys	Ala	Val	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Pro	Trp	Val	Ser	20	25	30	
Val	Phe	Gln	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	His	Cys	Glu	Val	Leu	His	Leu	35	40	45	
Pro	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	Leu	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Gln	50	55	60	
Thr	Ser	Thr	Pro	Ser	Tyr	Arg	Ile	Thr	Ser	Ala	Ser	Val	Asn	Asp	Ser	65	70	75	80
Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Arg	Gly	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Pro	Ile	85	90	95	
Gln	Leu	Glu	Ile	His	Arg	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Arg	100	105	110	
Val	Phe	Thr	Glu	Gly	Glu	Pro	Leu	Ala	Leu	Arg	Cys	His	Ala	Trp	Lys	115	120	125	
Asp	Lys	Leu	Val	Tyr	Asn	Val	Leu	Tyr	Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys	Ala	Phe	130	135	140	
Lys	Phe	Phe	His	Trp	Asn	Ser	Asn	Leu	Thr	Ile	Leu	Lys	Thr	Asn	Ile	145	150	155	160
Ser	His	Asn	Gly	Thr	Tyr	His	Cys	Ser	Gly	Met	Gly	Lys	His	Arg	Tyr	165	170	175	
Thr	Ser	Ala	Gly	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Phe	Pro	Ala	Pro	180	185	190	
Val	Leu	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Glu	Gly	Asn	Leu	Val	195	200	205	
Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Gln	210	215	220	
Leu	Tyr	Phe	Ser	Phe	Tyr	Met	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Arg	Gly	Arg	Asn	225	230	235	240
Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Thr	Ala	Arg	Arg	Glu	Asp	Ser	Gly	245	250	255	

ES 2 856 272 T3

Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
260 265 270

Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro
275 280 285

Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu
290 295 300

Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys
305 310 315 320

Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys
325 330 335

Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys
340 345 350

Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys
355 360 365

Glu Pro Gln Gly Ala Thr
370

<210> 17

<211> 951

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(951)

<400> 17

atg act atg gag acc caa atg tct cag aat gta tgt ccc aga aac ctg 48
Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
1 5 10 15

tgg ctg ctt caa cca ttg aca gtt ttg ctg ctg ctg gct tct gca gac 96
Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp
20 25 30

agt caa gct gct ccc cca aag gct gtg ctg aaa ctt gag ccc ccg tgg 144
Ser Gln Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp
35 40 45

atc aac gtg ctc cag gag gac tct gtg act ctg aca tgc cag ggg gct 192
Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala
50 55 60

cgc agc cct gag agc gac tcc att cag tgg ttc cac aat ggg aat ctc 240
Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
65 70 75 80

10

ES 2 856 272 T3

att ccc acc cac acg cag ccc agc tac agg ttc aag gcc aac aac aat Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn 85 90 95	288
gac agc ggg gag tac acg tgc cag act ggc cag acc agc ctc agc gac Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp 100 105 110	336
cct gtg cat ctg act gtg ctt tcc gaa tgg ctg gtg ctc cag acc cct Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro 115 120 125	384
cac ctg gag ttc cag gag gga gaa acc atc atg ctg agg tgc cac agc His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser 130 135 140	432
tgg aag gac aag cct ctg gtc aag gtc aca ttc ttc cag aat gga aaa Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys 145 150 155 160	480
tcc cag aaa ttc tcc cat ttg gat ccc acc ttc tcc atc cca caa gca Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala 165 170 175	528
aac cac agt cac agt ggt gat tac cac tgc aca gga aac ata ggc tac Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr 180 185 190	576
acg ctg ttc tca tcc aag cct gtg acc atc act gtc caa gtg ccc agc Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser 195 200 205	624
atg ggc agc tct tca cca atg ggg gtc att gtg gct gtg gtc att gcg Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Val Ile Val Ala Val Val Ile Ala 210 215 220	672
act gct gta gca gcc att gtt gct gct gta gtg gcc ttg atc tac tgc Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys 225 230 235 240	720
agg aaa aag cgg att tca gcc aat tcc act gat cct gtg aag gct gcc Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala 245 250 255	768
caa ttt gag cca cct gga cgt caa atg att gcc atc aga aag aga caa Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln 260 265 270	816
ctt gaa gaa acc aac aat gac tat gaa aca gct gac ggc ggc tac atg Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met 275 280 285	864
act ctg aac ccc agg gca cct act gac gat gat aaa aac atc tac ctg Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu 290 295 300	912
act ctt cct ccc aac gac cat gtc aac agt aat aac taa Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn 305 310 315	951

<210> 18

<211> 316

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

ES 2 856 272 T3

Met	Thr	Met	Glu	Thr	Gln	Met	Ser	Gln	Asn	Val	Cys	Pro	Arg	Asn	Leu
1				5					10					15	
Trp	Leu	Leu	Gln	Pro	Leu	Thr	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Asp
			20					25					30		
Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Pro	Lys	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Glu	Pro	Pro	Trp
		35					40					45			
Ile	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gln	Gly	Ala
	50					55					60				
Arg	Ser	Pro	Glu	Ser	Asp	Ser	Ile	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Gly	Asn	Leu
65					70					75					80
Ile	Pro	Thr	His	Thr	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ala	Asn	Asn	Asn
				85					90					95	
Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Gln	Thr	Gly	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp
			100					105					110		
Pro	Val	His	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Val	Leu	Gln	Thr	Pro
		115					120					125			
His	Leu	Glu	Phe	Gln	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Arg	Cys	His	Ser
	130					135					140				
Trp	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
145					150					155					160
Ser	Gln	Lys	Phe	Ser	His	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala
				165					170					175	
Asn	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr
			180					185					190		
Thr	Leu	Phe	Ser	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Val	Pro	Ser
		195					200					205			
Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Val	Ile	Val	Ala	Val	Val	Ile	Ala
	210					215					220				
Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Ile	Tyr	Cys

ES 2 856 272 T3

225					230						235					240
Arg	Lys	Lys	Arg	Ile 245	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr 250	Asp	Pro	Val	Lys	Ala 255	Ala	
Gln	Phe	Glu	Pro 260	Pro	Gly	Arg	Gln	Met 265	Ile	Ala	Ile	Arg	Lys 270	Arg	Gln	
Leu	Glu	Glu 275	Thr	Asn	Asn	Asp	Tyr 280	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly 285	Gly	Tyr	Met	
Thr	Leu 290	Asn	Pro	Arg	Ala	Pro 295	Thr	Asp	Asp	Asp	Lys 300	Asn	Ile	Tyr	Leu	
Thr 305	Leu	Pro	Pro	Asn	Asp 310	His	Val	Asn	Ser	Asn 315	Asn					

<210> 19
<211> 876
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(876)

[illegible]

ES 2 856 272 T3

Cys	Gln	Thr	Gly	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Pro	Val	His	Leu	Thr	Val		
		115					120					125					
ctt	tct	gag	tgg	ctg	gtg	ctc	cag	acc	cct	cac	ctg	gag	ttc	cag	gag	432	
Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Val	Leu	Gln	Thr	Pro	His	Leu	Glu	Phe	Gln	Glu		
	130					135					140						
gga	gaa	acc	atc	gtg	ctg	agg	tgc	cac	agc	tgg	aag	gac	aag	cct	ctg	480	
Gly	Glu	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Cys	His	Ser	Trp	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu		
145				150					155						160		
gtc	aag	gtc	aca	ttc	ttc	cag	aat	gga	aaa	tcc	aag	aaa	ttt	tcc	cgt	528	
Val	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Ser	Arg		
			165					170						175			
tcg	gat	ccc	aac	ttc	tcc	atc	cca	caa	gca	aac	cac	agt	cac	agt	ggt	576	
Ser	Asp	Pro	Asn	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly		
		180					185						190				
gat	tac	cac	tgc	aca	gga	aac	ata	ggc	tac	acg	ctg	tac	tca	tcc	aag	624	
Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys		
	195					200						205					
cct	gtg	acc	atc	act	gtc	caa	gct	ccc	agc	tct	tca	ccg	atg	ggg	atc	672	
Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Ile		
	210					215					220						
att	gtg	gct	gtg	gtc	act	ggg	att	gct	gta	gcg	gcc	att	gtt	gct	gct	720	
Ile	Val	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Ala		
225					230				235					240			
gta	gtg	gcc	ttg	atc	tac	tgc	agg	aaa	aag	cgg	att	tca	gcc	aat	ccc	768	
Val	Val	Ala	Leu	Ile	Tyr	Cys	Arg	Lys	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Asn	Pro		
			245					250						255			
act	aat	cct	gat	gag	gct	gac	aaa	gtt	ggg	gct	gag	aac	aca	atc	acc	816	
Thr	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala	Asp	Lys	Val	Gly	Ala	Glu	Asn	Thr	Ile	Thr		
		260					265						270				
tat	tca	ctt	ctc	atg	cac	ccg	gat	gct	ctg	gaa	gag	cct	gat	gac	cag	864	
Tyr	Ser	Leu	Leu	Met	His	Pro	Asp	Ala	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Asp	Gln		
		275				280						285					
aac	cgt	att	tag													876	
Asn	Arg	Ile															
	290																

<210> 20

<211> 291

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

Met	Gly	Ile	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Thr	Glu	Ser	Asp	Trp
1				5					10					15	

Ala	Asp	Cys	Lys	Ser	Pro	Gln	Pro	Trp	Gly	His	Met	Leu	Leu	Trp	Thr
		20						25					30		

ES 2 856 272 T3

Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
35 40 45

Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
50 55 60

Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
65 70 75 80

Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
85 90 95

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
100 105 110

Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
115 120 125

Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
130 135 140

Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
145 150 155 160

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
165 170 175

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
180 185 190

Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
195 200 205

Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile
210 215 220

Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
225 230 235 240

Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro
245 250 255

Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr
260 265 270

Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln
275 280 285

Asn Arg Ile
290

<210> 21
<211> 765
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS

ES 2 856 272 T3

<222> (1)..(765)

<400> 21

atg tgg cag ctg ctc cca act gct ctg cta ctt cta gtt tca gct	48
Met Trp Gln Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala	
1 5 10 15	
ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc ctg gag cct	96
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro	
20 25 30	
caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act ctg aag tgc cag	144
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln	
35 40 45	
gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt cac aat gag	192
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu	
50 55 60	
agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac gct gcc aca	240
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr	
65 70 75 80	
gtt gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc tcc acc ctc	288
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu	
85 90 95	
agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg ttg ctc cag	336
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gln Trp Leu Leu Leu Gln	
100 105 110	
gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac ctg agg tgt	384
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys	
115 120 125	
cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat tta cag aat	432
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn	
130 135 140	
ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc tac att cca	480
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro	
145 150 155 160	
aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc agg ggg ctt gtt	528
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val	
165 170 175	
ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc atc act caa	576
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln	
180 185 190	
ggg ttg tca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca cct ggg tac caa	624
Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln	
195 200 205	
gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg gac aca gga	672
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly	
210 215 220	
cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca aca aga gac tgg	720
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp	
225 230 235 240	
aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa gac aaa tga	765
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys	
245 250	

5

<210> 22

<211> 254

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 856 272 T3

<400> 22

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190

Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
245 250

5

<210> 23

<211> 702

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

10

<221> CDS

<222> (1)..(702)

ES 2 856 272 T3

<400> 23
atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta gtt tca gct 48
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15
ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc ctg gag cct 96
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30
caa tgg tac agc gtg ctt gag aag gac agt gtg act ctg aag tgc cag 144
Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45
gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt cac aat gag 192
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60
agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac gct gcc aca 240
Ser Leu Ile Ser Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80
gtc aac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc tcc acc ctc 288
Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95
agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg ttg ctc cag 336
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110
gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac ctg agg tgt 384
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125
cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat tta cag aat 432
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140
ggc aaa gac agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc cac att cca 480
Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
145 150 155 160
aaa gcc aca ctc aaa gat agc ggc tcc tac ttc tgc agg ggg ctt gtt 528
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175
ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc atc act caa 576
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190
ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc tct cca cct ggg tac caa 624
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205
gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg gac aca gga 672
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220
cta tat ttc tct gtg aag aca aac att tga 702
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225 230

5 <210> 24
<211> 233
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 24

ES 2 856 272 T3

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140

Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225 230

5 <210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 25
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 26
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 26
 Ser Gly Gly Gly
 1
 10 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 15 <400> 27
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 28
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5
 25 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 29
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 30
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 30
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5
 40 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 31

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 32
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

10 <210> 33
<211> 464
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 33
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

ES 2 856 272 T3

Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Lys	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ser	Leu	Cys	Ser	Thr	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Val	Val	Ile	Ala	130	135	140
Cys	Leu	Val	Gln	Gly	Phe	Phe	Pro	Gln	Glu	Pro	Leu	Ser	Val	Thr	Trp	145	150	155
Ser	Glu	Ser	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ala	Arg	Asn	Phe	Pro	Pro	Ser	Gln	165	170	175
Asp	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Tyr	Thr	Thr	Ser	Ser	Gln	Leu	Thr	Leu	Pro	180	185	190
Ala	Thr	Gln	Cys	Leu	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Thr	Cys	His	Val	Lys	His	195	200	205
Tyr	Thr	Asn	Pro	Ser	Gln	Asp	Val	Thr	Val	Pro	Cys	Pro	Val	Pro	Ser	210	215	220
Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Ser	225	230	235
Cys	Cys	His	Pro	Arg	Leu	Ser	Leu	His	Arg	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	245	250	255
Leu	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Arg	260	265	270
Asp	Ala	Ser	Gly	Val	Thr	Phe	Thr	Trp	Thr	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	275	280	285
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	Arg	Asp	Leu	Cys	Gly	Cys	Tyr	Ser	Val	290	295	300
Ser	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Cys	Ala	Glu	Pro	Trp	Asn	His	Gly	Lys	Thr	305	310	315
Phe	Thr	Cys	Thr	Ala	Ala	Tyr	Pro	Glu	Ser	Lys	Thr	Pro	Leu	Thr	Ala	325	330	335
Thr	Leu	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Phe	Arg	Pro	Glu	Val	His	Leu	Leu	340	345	350
Pro	Pro	Pro	Ser	Glu	Glu	Leu	Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Thr	355	360	365

ES 2 856 272 T3

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
370 375 380

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385 390 395 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
405 410 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
420 425 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
435 440 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
450 455 460

<210> 34

<211> 458

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

10

ES 2 856 272 T3

Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu
 115 120 125
 Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln
 130 135 140
 Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly
 165 170 175
 Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys
 180 185 190
 Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro
 195 200 205
 Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr
 210 215 220
 Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro
 225 230 235 240
 Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser
 245 250 255
 Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly
 260 265 270
 Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly
 275 280 285
 Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu
 290 295 300
 Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys
 325 330 335
 Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
 340 345 350
 Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
 355 360 365

ES 2 856 272 T3

Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
370 375 380

Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
385 390 395 400

Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
405 410 415

Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
420 425 430

Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala
435 440 445

Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455

<210> 35

<211> 460

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

10

ES 2 856 272 T3

Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu
 115 120 125
 Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln
 130 135 140
 Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly
 165 170 175
 Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys
 180 185 190
 Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro
 195 200 205
 Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr
 210 215 220
 Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro
 225 230 235 240
 Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser
 245 250 255
 Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly
 260 265 270
 Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly
 275 280 285
 Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu
 290 295 300
 Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys
 325 330 335
 Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
 340 345 350
 Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
 355 360 365

ES 2 856 272 T3

Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
370 375 380

Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
385 390 395 400

Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
405 410 415

Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
420 425 430

Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala
435 440 445

Gly Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
450 455 460

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

10

ES 2 856 272 T3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

10

ES 2 856 272 T3

100

105

110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 38

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

10

ES 2 856 272 T3

Ala	Arg	Pro	Arg	Trp	Glu	Thr	Ala	Ile	Ser	Ser	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	210	215	220	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	225	230	235	240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	260	265	270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	275	280	285	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	290	295	300	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	305	310	315	320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	325	330	335	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro				

ES 2 856 272 T3

340

345

350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Ser Pro Leu
85 90 95

10

ES 2 856 272 T3

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
			100					105					110			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
		115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
	130					135					140					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
145					150					155					160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				165					170					175		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
			180					185					190			
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
		195					200					205				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
	210															

REIVINDICACIONES

1.- Un método para producir un anticuerpo que es capaz de eliminar selectivamente agregados de proteínas que causan enfermedades con preferencia a los monómeros de proteínas del plasma, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

5 (a) seleccionar un anticuerpo:

(A) en el que la proporción de la KD (constante de disociación) del anticuerpo a dichos agregados de proteínas bajo un pH intracelular de 5,8 y una concentración de iones calcio de 3 μ M a un pH extracelular de 7,4 y una concentración de iones calcio de 1,2 mM es de 2 o más:

10 (B) en el que la actividad de unión al receptor FcRn de un complejo formado entre dichos agregados de proteínas y el anticuerpo es mayor que la actividad de unión al receptor FcRn de un complejo formado entre la proteína no agregada y el anticuerpo; y

(C) en el que la proporción de la eliminación plasmática de dicha proteína agregada en ausencia de dicho anticuerpo a la eliminación plasmática de dicha proteína agregada en presencia de dicho anticuerpo es de 1,5 o más veces mayor que la misma proporción de eliminación plasmática para dicha proteína no agregada;

15 (b) cultivar una célula hospedante que comprende un vector que porta un gen que codifica el anticuerpo seleccionado en la etapa (a); y

(c) aislar el anticuerpo del cultivo obtenido en la etapa (b).

20 2.- El método de la reivindicación 1, en el que la proteína es huntingtina, ataxina-1, ataxina-2, α 1A del canal de Ca, ataxina-7, proteína de unión a TATA, MDJ, DRPLA, receptor de andrógenos, α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, neuroserpina, inhibidor de C1, antitrombina III, A β , L-ch, transtiretina, SAA, β 2M, H-ch, cistatina C, α sinucleína, amilina, hemoglobina, cristalina, IgA, proteína Tau, proteína de unión al sitio TAR del ADN de 43 kDa (TDP-43), superóxido dismutasa (SOD1), FUS (condensado en el gen del sarcoma), prion, PHOX2B, ARX, proteína de unión a poliadenilato nuclear 1 (PABPN1), disferlina, desmina, GFAP o queratina 5/14.

25 3.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende una región Fc que es una región Fc representada por una cualquiera de las SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12.

4.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que, en una condición de pH ácido, la actividad de unión a FcRn de la región Fc comprendida en el anticuerpo aumenta en comparación con la de la región Fc representada por una cualquiera de las SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12.

30 5.- El método de la reivindicación 4, en el que la región Fc es una región Fc en la que al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos en las posiciones 238, 244, 245, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 265, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 316, 317, 318, 332, 339, 340, 341, 343, 356, 360, 362, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 385, 386, 387, 388, 389, 400, 413, 415, 423, 424, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 438, 439, 440, 442 y 447, según la numeración EU, están sustituidos en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por una cualquiera de las SEQ ID
35 NO:9, 10, 11 o 12.

6.- El método de la reivindicación 5, en el que la región Fc comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

Leu para el aminoácido en la posición 238;

Leu para el aminoácido en la posición 244;

40 Arg para el aminoácido en la posición 245;

Pro para el aminoácido en la posición 249;

Gln o Glu para el aminoácido en la posición 250, o

Arg, Asp, Glu o Leu para el aminoácido en la posición 251;

Phe, Ser, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 252;

45 Ser o Thr para el aminoácido en la posición 254;

Arg, Gly, Ile o Leu para el aminoácido en la posición 255;

Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 256;

- Ala, Ile, Met, Asn, Ser o Val para el aminoácido en la posición 257;
 Asp para el aminoácido en la posición 258;
 Ser para el aminoácido en la posición 260;
 Leu para el aminoácido en la posición 262;
- 5 Lys para el aminoácido en la posición 270;
 Leu o Arg para el aminoácido en la posición 272;
 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 279;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 283;
 Asn para el aminoácido en la posición 285;
- 10 Phe para el aminoácido en la posición 286;
 Asn o Pro para el aminoácido en la posición 288;
 Val para el aminoácido en la posición 293;
 Ala, Glu, Gln o Met para el aminoácido en la posición 307;
 Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val o Trp para el aminoácido en la posición 311;
- 15 Pro para el aminoácido en la posición 309;
 Ala, Asp o Pro para el aminoácido en la posición 312;
 Ala o Leu para el aminoácido en la posición 314;
 Lys para el aminoácido en la posición 316;
 Pro para el aminoácido en la posición 317;
- 20 Asn o Thr para el aminoácido en la posición 318;
 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser o Trp para el aminoácido en la posición 332;
 Asn, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 339;
 Pro para el aminoácido en la posición 341;
 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 343;
- 25 Arg para el aminoácido en la posición 375;
 Gly, Ile, Met, Pro, Thr o Val para el aminoácido en la posición 376;
 Lys para el aminoácido en la posición 377;
 Asp, Asn o Val para el aminoácido en la posición 378;
 Ala, Asn, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 380;
- 30 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 382;
 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 385;
 Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 386;
 Ala, Arg, His, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 387;
 Asn, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 389;
- 35 Asn para el aminoácido en la posición 423;
 Asn para el aminoácido en la posición 427;
 Leu, Met, Phe, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 428;

- Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 430;
His o Asn para el aminoácido en la posición 431;
Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 433;
Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434;
- 5 Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met o Thr para el aminoácido en la posición 436;
Lys, Leu, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 438;
Lys para el aminoácido en la posición 440, o
Lys para el aminoácido en la posición 442; y
Ile, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 308;
- 10 como se indica mediante la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por una cualquiera de las SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12.
- 7.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que, en una condición de intervalo de pH neutro, la actividad de unión a FcRn de la región Fc comprendida en el anticuerpo se potencia en comparación con la de la región Fc representada por una cualquiera de las SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12.
- 15 8.- El método de la reivindicación 7, en el que la región Fc es una región Fc en la que al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos en las posiciones 237, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 y 436, según la numeración EU, están sustituidos en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por una cualquiera de las SEQ ID NO:9, 10, 11 o 12.
- 20 9.- El método de la reivindicación 8, en el que la región Fc comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de:
Met para el aminoácido en la posición 237;
Ile para el aminoácido en la posición 248;
Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 250;
- 25 Phe, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 252;
Thr para el aminoácido en la posición 254;
Glu para el aminoácido en la posición 255;
Asp, Asn, Glu o Gln para el aminoácido en la posición 256;
Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 257;
- 30 His para el aminoácido en la posición 258;
Ala para el aminoácido en la posición 265;
Ala o Glu para el aminoácido en la posición 286;
His para el aminoácido en la posición 289;
Ala para el aminoácido en la posición 297;
- 35 Ala para el aminoácido en la posición 303;
Ala para el aminoácido en la posición 305;
Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 307;
Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 308;
Ala, Asp, Glu, Pro o Arg para el aminoácido en la posición 309;
- 40 Ala, His o Ile para el aminoácido en la posición 311;

- Ala o His para el aminoácido en la posición 312;
 Lys o Arg para el aminoácido en la posición 314;
 Ala, Asp o His para el aminoácido en la posición 315;
 Ala para el aminoácido en la posición 317;
- 5 Val para el aminoácido en la posición 332;
 Leu para el aminoácido en la posición 334;
 His para el aminoácido en la posición 360;
 Ala para el aminoácido en la posición 376;
 Ala para el aminoácido en la posición 380;
- 10 Ala para el aminoácido en la posición 382;
 Ala para el aminoácido en la posición 384;
 Asp o His para el aminoácido en la posición 385;
 Pro para el aminoácido en la posición 386;
 Glu para el aminoácido en la posición 387;
- 15 Ala o Ser para el aminoácido en la posición 389;
 Ala para el aminoácido en la posición 424;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 428;
 Lys para el aminoácido en la posición 433;
 Ala, Phe, His, Ser, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434; y
- 20 His, Ile, Leu, Phe, Thr o Val para el aminoácido en la posición 436;
- como se indica mediante la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos de la región Fc representada por una cualquiera de las SEQ ID NO:9, 10, 11 y 12.
- 10.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo comprende una región Fc que incluye una región Fc que tiene una mayor actividad de unión al receptor Fcy que la de la región Fc de una IgG humana nativa.
- 25 11.- El método de la reivindicación 10, en el que la región Fc comprende en su secuencia de aminoácidos al menos uno o más aminoácidos que son diferentes de los aminoácidos de la región Fc de IgG humana nativa seleccionados del grupo de posiciones 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 250, 251, 254, 255, 256, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296,
- 30 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 311, 313, 315, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 376, 377, 378, 379, 380, 382, 385, 392, 396, 421, 427, 428, 429, 434, 436 y 440 (numeración EU).
- 12.- El método de la reivindicación 11, en el que la región Fc comprende en su secuencia de aminoácidos al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de:
- 35 Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 221;
 Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 222;
 Phe, Trp, Glu o Lys para el aminoácido en la posición 223;
 Phe, Trp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 224;
 Glu, Lys o Trp para el aminoácido en la posición 225;
- 40 Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 227;
 Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 228;

- Ala, Glu, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 230;
- Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 231;
- Glu, Gly, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 232;
- Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 233;
- 5 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 234;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 235;
- Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 236;
- Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 237;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 238;
- 10 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 239;
- Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 240;
- Asp, Glu, Leu, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 241;
- Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 243;
- His para el aminoácido en la posición 244;
- 15 Ala para el aminoácido en la posición 245;
- Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 246;
- Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 247;
- Glu, His, Gln o Tyr para el aminoácido en la posición 249;
- Glu o Gln para el aminoácido en la posición 250;
- 20 Phe para el aminoácido en la posición 251;
- Phe, Met o Tyr para el aminoácido en la posición 254;
- Glu, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 255;
- Ala, Met o Pro para el aminoácido en la posición 256;
- Asp, Glu, His, Ser o Tyr para el aminoácido en la posición 258;
- 25 Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 260;
- Ala, Glu, Phe, Ile o Thr para el aminoácido en la posición 262;
- Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 263;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 264;
- Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 265;
- 30 Ala, Ile, Met o Thr para el aminoácido en la posición 266;
- Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 267;
- Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 268;
- Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 269;
- Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 270;
- 35 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 271;
- Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 272;
- Phe o Ile para el aminoácido en la posición 273;

- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 274;
 Leu o Trp para el aminoácido en la posición 275;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 276;
 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 278;
- 5 Ala para el aminoácido en la posición 279;
 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 280;
 Asp, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 281;
 Glu, Gly, Lys, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 282;
 Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg o Tyr para el aminoácido en la posición 283;
- 10 Asp, Glu, Leu, Asn, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 284;
 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 285;
 Glu, Gly, Pro o Tyr para el aminoácido en la posición 286;
 Asn, Asp, Glu o Tyr para el aminoácido en la posición 288;
 Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 290;
- 15 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln o Thr para el aminoácido en la posición 291;
 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 292;
 Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 293;
 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 294;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 295;
- 20 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr o Val para el aminoácido en la posición 296;
 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 297;
 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 298;
 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 299;
 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp para el aminoácido en la posición 300;
- 25 Asp, Glu, His o Tyr para el aminoácido en la posición 301;
 Ile para el aminoácido en la posición 302;
 Asp, Gly o Tyr para el aminoácido en la posición 303;
 Asp, His, Leu, Asn o Thr para el aminoácido en la posición 304;
 Glu, Ile, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 305;
- 30 Ala, Asp, Asn, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 311;
 Phe para el aminoácido en la posición 313;
 Leu para el aminoácido en la posición 315;
 Glu o Gln para el aminoácido en la posición 317;
 His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 318;
- 35 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 320;
 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 322;
 Ile para el aminoácido en la posición 323;

- Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 324;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 325;
- Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 326;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 327;
- 5 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 328;
- Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 329;
- Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 330;
- Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 331;
- Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 332;
- 10 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 333;
- Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro o Thr para el aminoácido en la posición 334;
- Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 335;
- Glu, Lys o Tyr para el aminoácido en la posición 336;
- Glu, His o Asn para el aminoácido en la posición 337;
- 15 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 339;
- Ala o Val para el aminoácido en la posición 376;
- Gly o Lys para el aminoácido en la posición 377;
- Asp para el aminoácido en la posición 378;
- Asn para el aminoácido en la posición 379;
- 20 Ala, Asn o Ser para el aminoácido en la posición 380;
- Ala o Ile para el aminoácido en la posición 382;
- Glu para el aminoácido en la posición 385;
- Thr para el aminoácido en la posición 392;
- Leu para el aminoácido en la posición 396;
- 25 Lys para el aminoácido en la posición 421;
- Asn para el aminoácido en la posición 427;
- Phe o Leu para el aminoácido en la posición 428;
- Met para el aminoácido en la posición 429;
- Trp para el aminoácido en la posición 434;
- 30 Ile para el aminoácido en la posición 436; y
- Gly, His, Ile, Leu o Tyr para el aminoácido en la posición 440;
- como se indica mediante la numeración EU.
- 13.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo comprende una región Fc que tiene una mayor actividad de unión hacia un receptor Fcγ inhibidor que hacia un receptor Fcγ activador.
- 35 14.- El método de la reivindicación 13, en el que el receptor Fcγ inhibidor es FcγRIIb humano.
- 15.- El método de la reivindicación 13 o 14, en el que el receptor Fcγ activador es FcγRIa humano, FcγRIIa (R) humano, FcγRIIa (H) humano, FcγRIIIa (V) humano o FcγRIIIa (F) humano.

16.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el aminoácido en la posición 238 o 328 (numeración EU) en la región Fc es diferente del aminoácido en la región Fc de IgG humana nativa.

17.- El método de la reivindicación 16, en el que el aminoácido en la posición 238 de la región Fc es Asp o el aminoácido en la posición 328 de la región Fc es Glu, como se indica mediante la numeración EU.

- 5 18.- El método de la reivindicación 16 o 17, en el que la secuencia de aminoácidos de la región Fc comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

Asp para el aminoácido en la posición 233;

Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 234;

Ala, Asp, Glu, Leu, Met, Phe, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 237;

- 10 Asp para el aminoácido en la posición 239;

Ala, Gln o Val para el aminoácido en la posición 267;

Asn, Asp o Glu para el aminoácido en la posición 268;

Gly para el aminoácido en la posición 271;

Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 326;

- 15 Arg, Lys o Met para el aminoácido en la posición 330;

Ile, Leu o Met para el aminoácido en la posición 323; y

Asp para el aminoácido en la posición 296;

como se indica mediante la numeración EU.

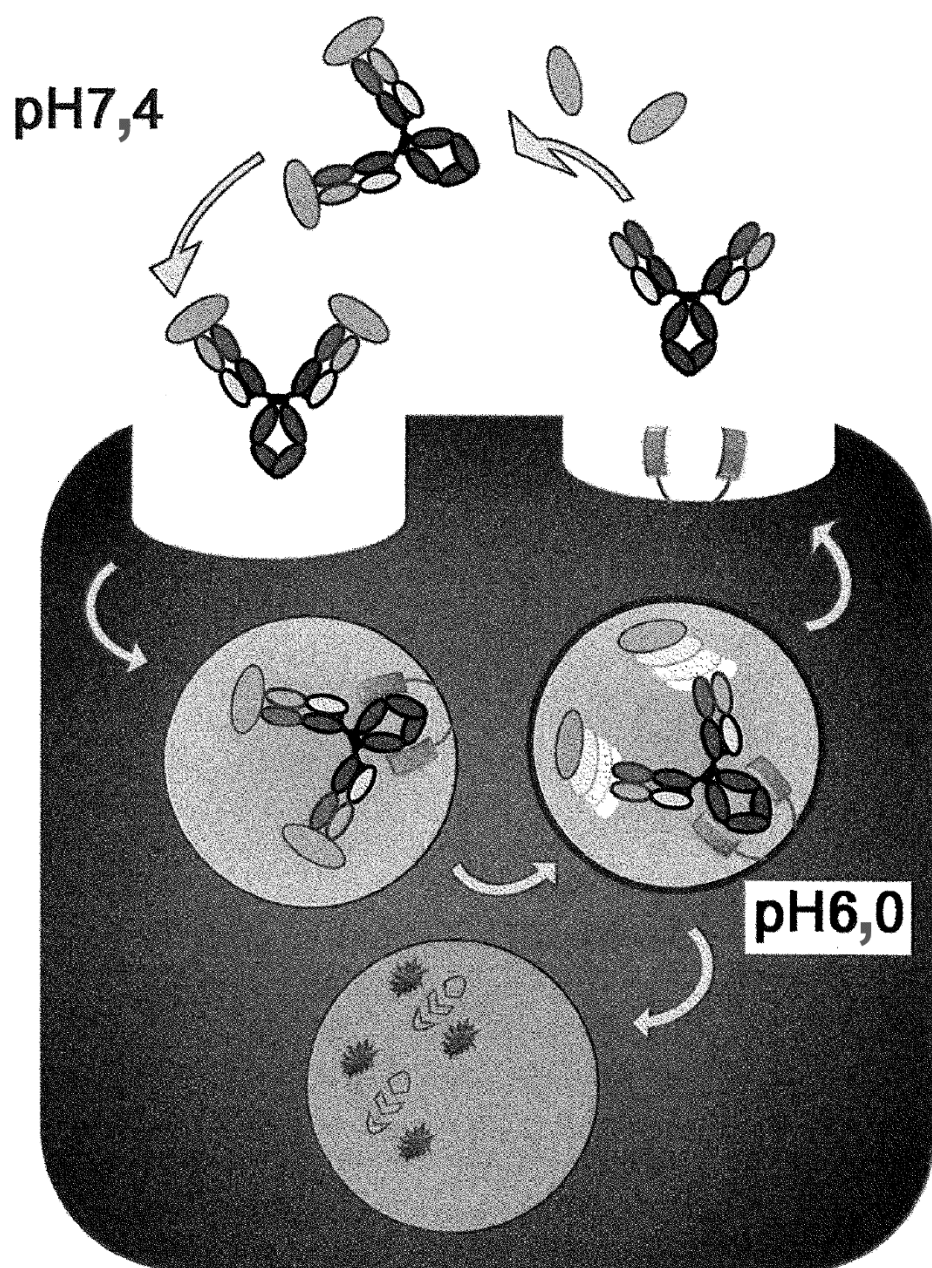


FIG. 1

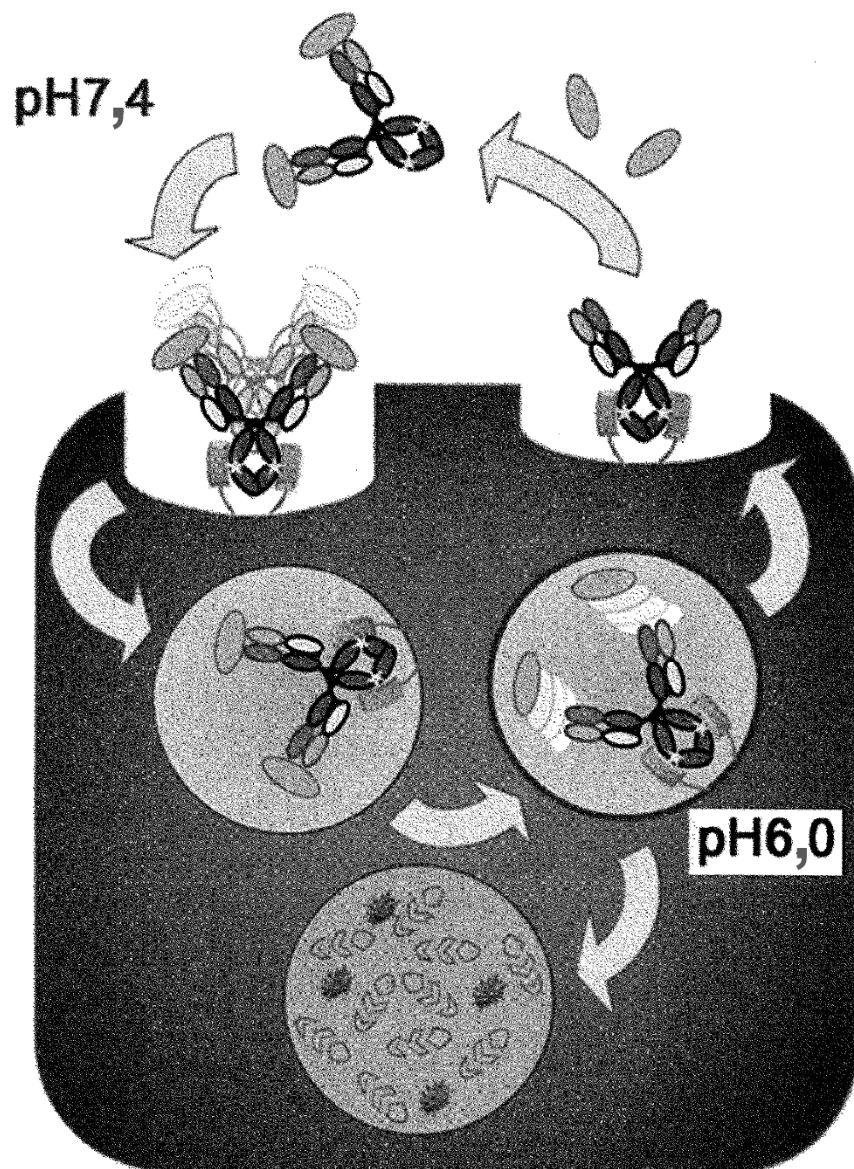


FIG. 2

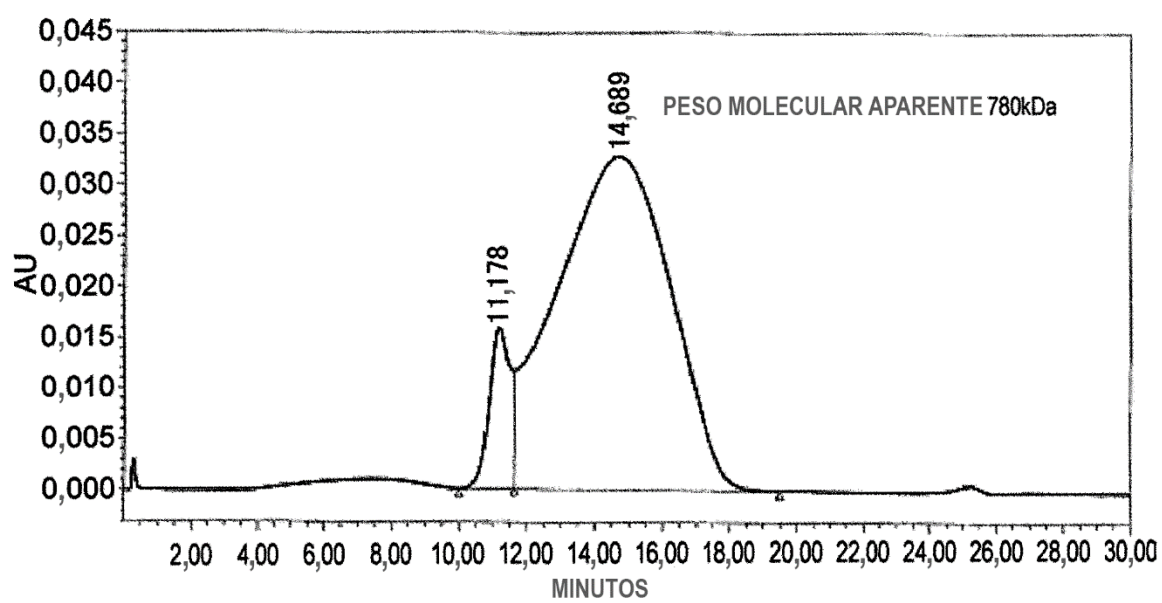


FIG. 3

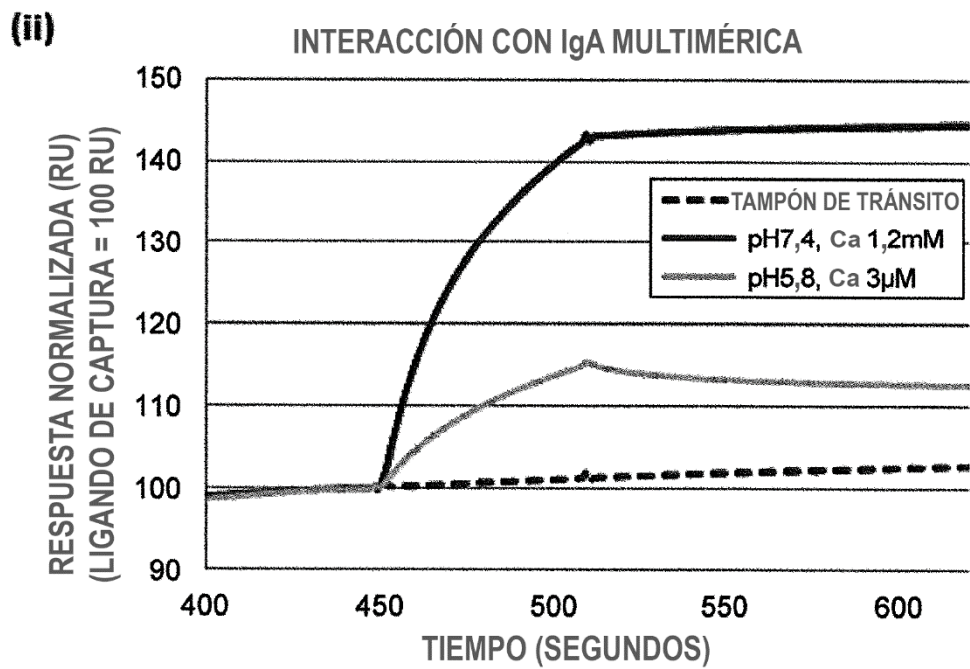
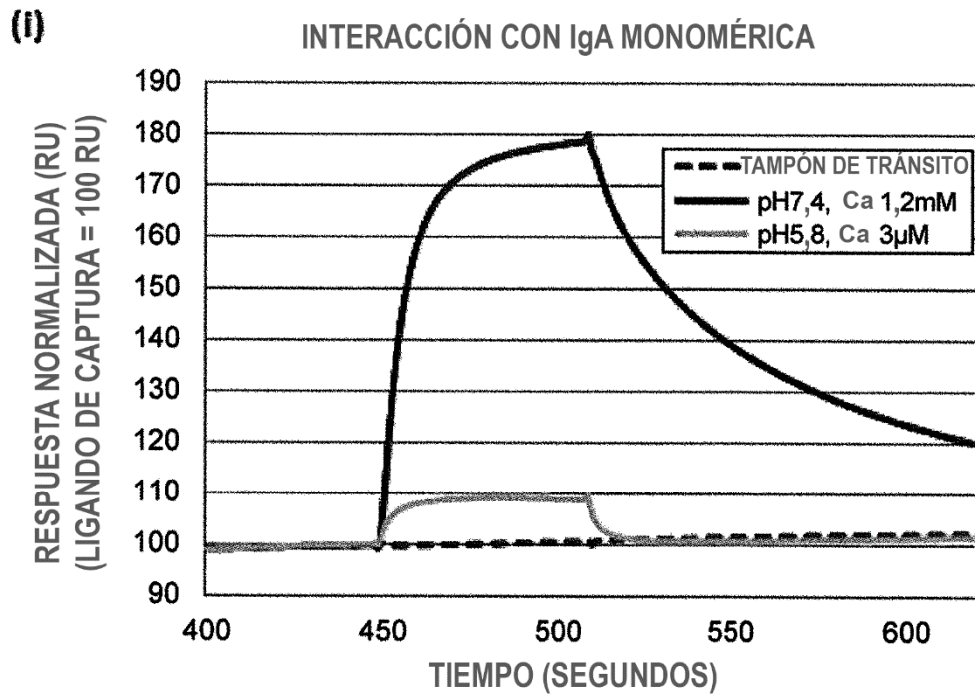


FIG. 4

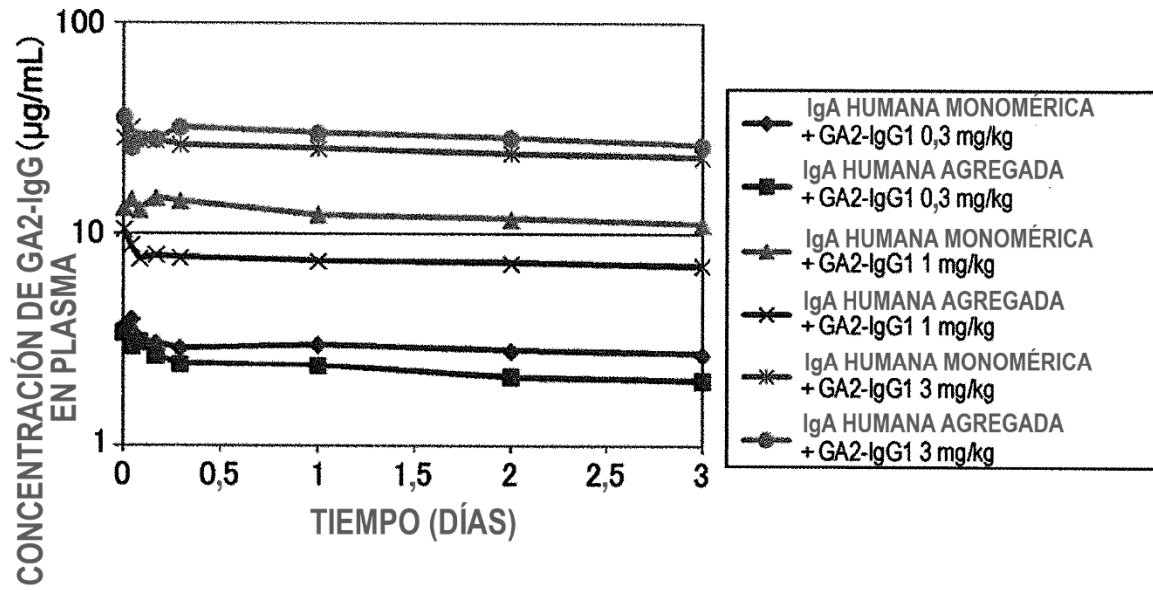


FIG. 5

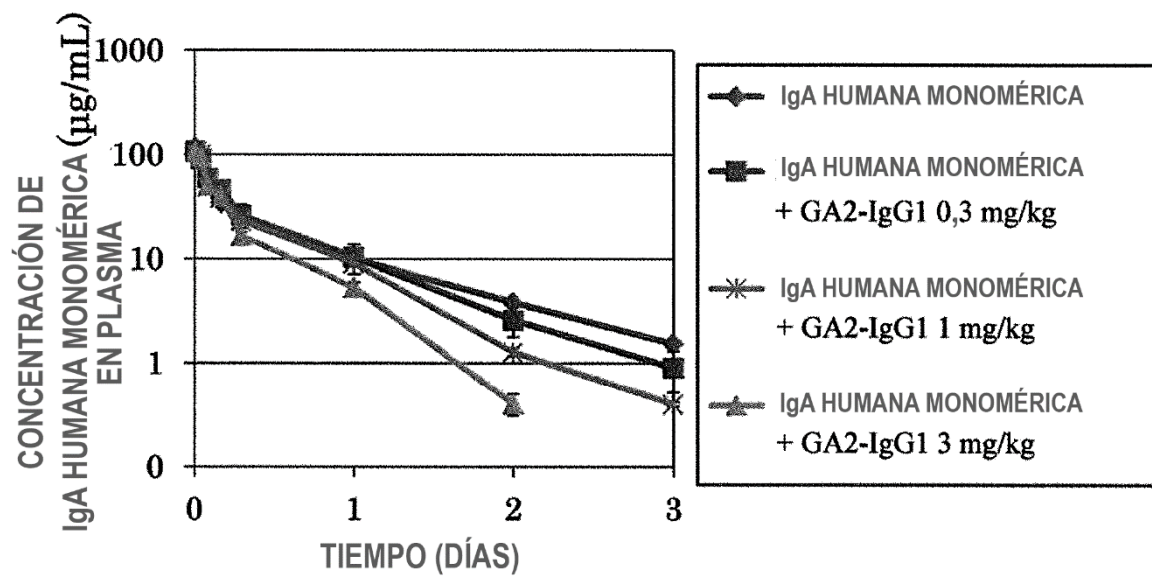


FIG. 6

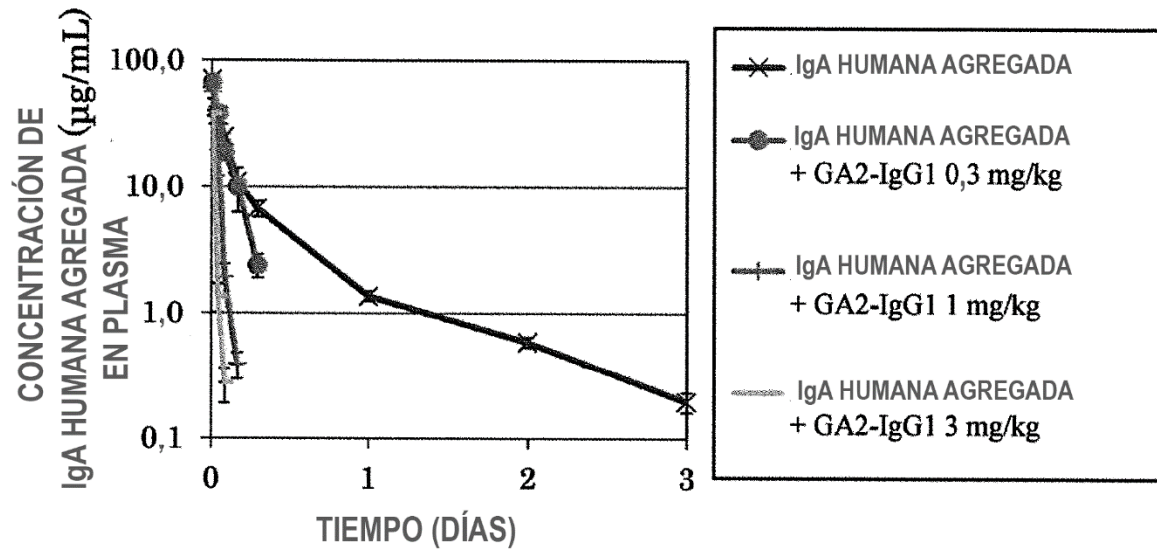


FIG. 7

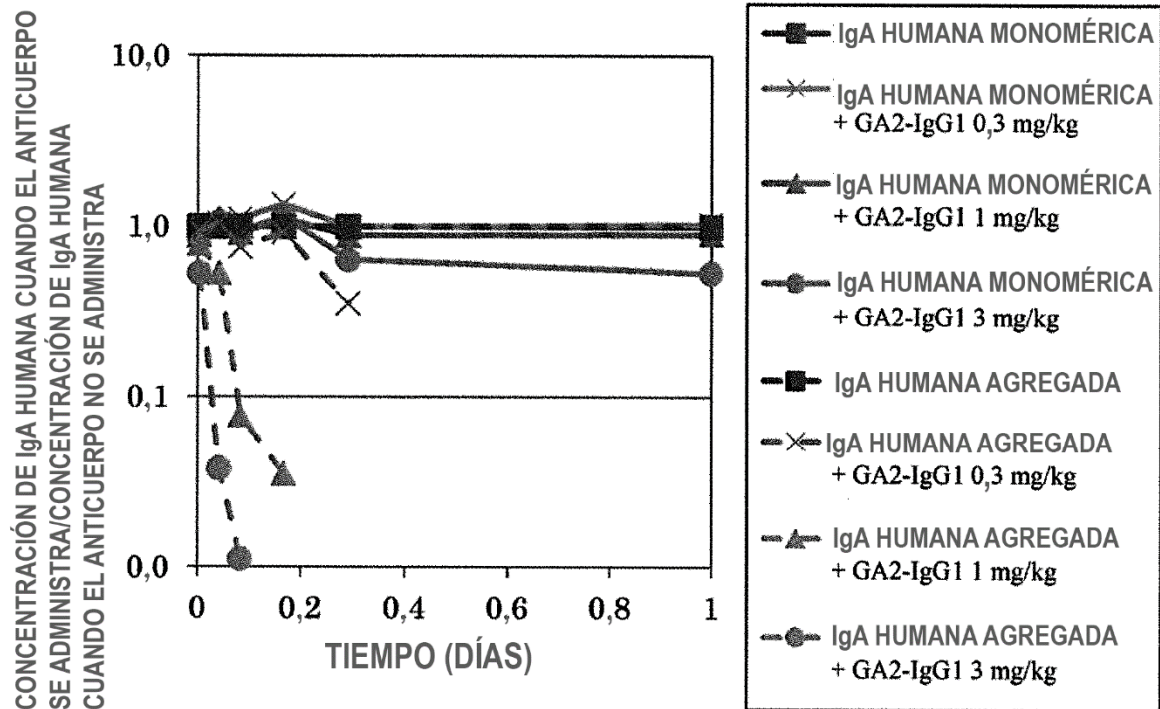


FIG. 8

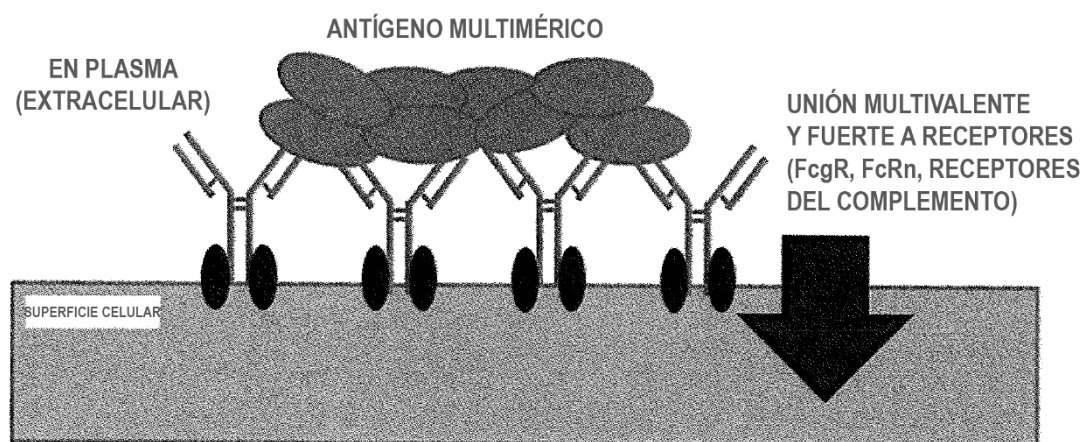


FIG. 9

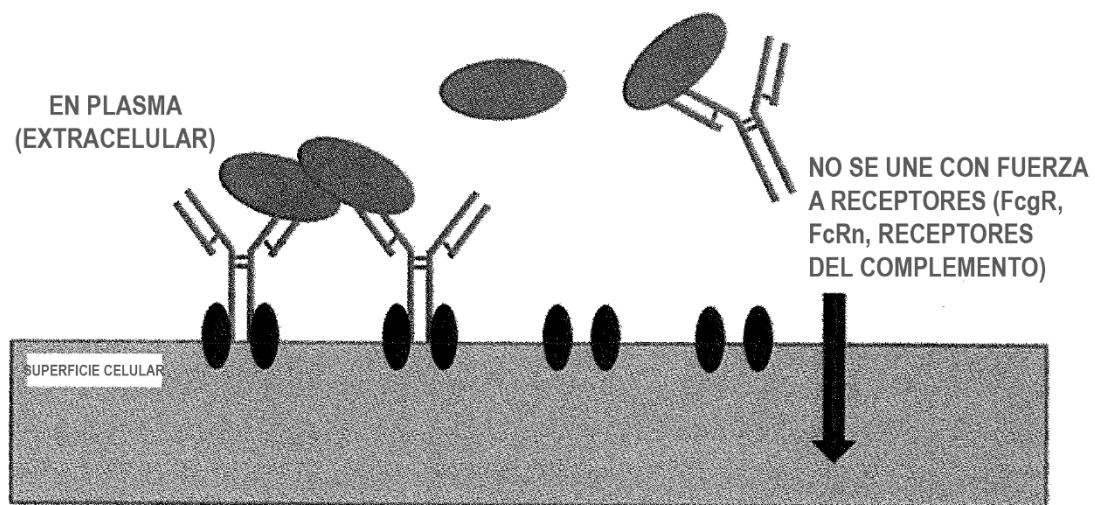


FIG. 10