(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 864 211**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01) ***A61P 39/00*** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2017 PCT/US2017/029375**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17189556**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2017 E 17790258 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021 EP 3448429**

(54) Título: **Anticuerpos anti-FcRn humanizados con maduración de la afinidad**

(30) Prioridad:

25.04.2016 US 201662326907 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2021

(73) Titular/es:

SYNTIMMUNE INC. (100.0%)
116 Huntington Avenue, Suite 301
Boston, MA 02116, US

(72) Inventor/es:

BLUMBERG, LAURENCE J.;
BLUMBERG, RICHARD S.;
JONES, SUSAN DANA;
ROOPENIAN, DERRY;
HOLGATE, ROBERT GEORGE EDWARD;
JONES, TIMOTHY DAVID y
HEARN, ARRON ROBERT

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

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

Anticuerpos anti-FcRn humanizados con maduración de la afinidad

Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos y sus porciones de unión a antígeno que se unen a FcRn y su uso para modular o inhibir la interacción de FcRn con la albúmina. Los anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos para minimizar los efectos tóxicos de ciertos compuestos o moléculas que se unen a la albúmina.

Antecedentes de la invención

El receptor Fc neonatal (FcRn) es un receptor Fc de membrana integral de tráfico intracelular para IgG. El FcRn se identificó originalmente como un receptor que funciona en la vida neonatal. Primero se aisló del intestino de roedores como un heterodímero entre una proteína de 12 kDa y una de 40-50 kDa (Rodewald y Kraehenbuhl 1984, J. Cell. Biol. 99 (1 Pt2): 159s-154s; Simister y Rees, 1985, Eur. J. Immunol. 15: 733-738) y se clonó en 1989 (Simister y Mostov, 1989, Nature 337: 184-187). La clonación y posterior cristalización de FcRn reveló que tiene una cadena pesada similar al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I de aproximadamente 50 kDa en asociación no covalente con una cadena ligera de microglobulina β2 de 12 kDa (Raghavan y otros, 1993, Biochemistry 32: 8654-8660; Huber y otros, 1993, J. Mol. Biol. 230: 1077-1083). Aunque se reconoció por primera vez en relación con la vida fetal y neonatal, en la actualidad se conoce que el FcRn continúa funcionando durante toda la vida adulta. El FcRn reside principalmente en los endosomas ácidos tempranos donde se une a la región Fc de IgG de una manera dependiente del pH, con afinidad micro a nanomolar a pH 6,5, mientras que la unión de FcRn a Fc a pH fisiológico es insignificante. La mayor parte de FcRn está presente en los endosomas en la mayoría de las células, y la interacción entre FcRn y sus ligandos IgG Fc se produce dentro de ese entorno ácido. En algunas células, como las células hematopoyéticas, pueden detectarse niveles significativos de FcRn en la superficie celular además de la expresión intracelular (Zhu y otros, 2001, J. Immunol. 166: 3266-3276). En este caso, cuando el medio extracelular es ácido, como en el caso de afecciones neoplásicas o infecciosas, es posible que FcRn pueda unirse a IgG en la superficie celular de estos tipos de células. El FcRn regula las concentraciones séricas de IgG tras unirse a la IgG monomérica endocitada y protegerla de la degradación en el compartimento lisosómico y transportar la IgG a la superficie celular para su liberación a pH extracelular neutro. A través de este mecanismo, FcRn es responsable de la vida media sérica prolongada de IgG, ya que la IgG que no está unida por FcRn ingresa a la vía lisosómica y se degrada.

El FcRn contiene un sitio de unión para la albúmina que es distinto de su sitio de unión para el dominio Fc de IgG, debido a interacciones iónicas entre FcRn e IgG o albúmina en caras opuestas de la cadena pesada de FcRn (Chaudhury y otros, 2006, Biochemistry 45: 4983-4990). Al igual que su unión a IgG, la unión de FcRn a la albúmina depende en gran medida del pH, y se produce a un pH ácido (típicamente menos de pH 6, y óptimamente a pH 5) pero no a pH neutro. La unión a FcRn de la albúmina protege a la albúmina de la degradación y da como resultado una vida media sérica prolongada para la albúmina. En ausencia de expresión de FcRn en ratones, la albúmina se pierde en la bilis desde la circulación. (Kim y otros, 2006, Am J Gastrointest Liver Physiol 290 (2): G352-60). Además, cada vez hay más pruebas de que la albúmina es patógena en entornos de enfermedades múltiples, por ejemplo, exposiciones tóxicas agudas y crónicas (Taguchi, J Pharm Sci 2012), enfermedad vascular periférica y coronaria aterosclerótica (Song, Atherosclerosis 2012), complicaciones vasculopáticas diabéticas (Kim, Diab Metab J 2012; Murea, Am J Nephrol 2012) y la enfermedad de Alzheimer (Byun, PLoS One 2012). Sand y otros, (Journal of Biological Chemistry, vol. 287, núm. 24, páginas 17228-17239) describen la disección de la interfaz FcRn-albúmina mediante el uso de mutagénesis y anticuerpos bloqueadores de albúmina anti-FcRn.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos y sus porciones de unión a antígeno que se unen a FcRn como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos se unen a un epítopo de FcRn que se superpone al sitio de unión para el dominio Fc de la albúmina y reducen o inhiben la unión de FcRn a la albúmina.

En la presente se describe un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a FcRn que comprende una región variable de cadena pesada, cuya región variable de cadena pesada comprende CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

la secuencia de CDR1 es la SEQ ID NO: 2;
la secuencia de CDR2 es la SEQ ID NO: 4; y
la secuencia de CDR3 es la SEQ ID NO: 48.

Alternativamente, la secuencia de CDR3 puede ser la SEQ ID NO: 46. Alternativamente, la secuencia de CDR3 puede ser la SEQ ID NO: 44.

La secuencia de CDR3 puede seleccionarse del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO 39, la SEQ ID NO 44, la SEQ ID NO 46 y la SEQ ID NO 48. La secuencia de CDR3 puede ser la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 31.

Además, en la presente se describe un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a FcRn que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde cada una de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera comprende CDR1, CDR2 y CDR3, y en donde:

la secuencia de CDR1 de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 2;
la secuencia de CDR2 de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 4; y
la secuencia de CDR3 de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 39; y
la secuencia de CDR1 de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 6;
la secuencia de CDR2 de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 8; y
la secuencia de CDR3 de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 10.

La secuencia de CDR3 de la cadena pesada puede ser la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 31.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente descripción es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno quimérico o humanizado.

Además, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno como se define en las reivindicaciones, que se une a FcRn que comprende una región variable de cadena pesada, en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, o la SEQ ID NO: 32.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende además una región variable de cadena ligera, en donde la secuencia de la región variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 22. En algunas modalidades, la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 28. En otras modalidades, la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 32.

Además, se proporciona un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno como se define en las reivindicaciones, que se une a FcRn que comprende una región variable de cadena ligera, en donde la secuencia de la región variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 22. Como se describe en la presente, la secuencia de la región variable de cadena ligera puede ser la SEQ ID NO: 22 y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende además una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende la región marco de la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, la secuencia de la región variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 22 y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende además una región variable de cadena pesada, en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 28. En otras modalidades, la secuencia de la región variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 22 y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende además una región variable de cadena pesada, en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 32.

Además, en la presente se describe un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a FcRn que comprende una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende la región marco de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16, o una región marco que es al menos 95 % idéntica a la región marco de la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. La región variable de cadena pesada puede comprender la región marco de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 12, o una región marco que es al menos 95 % idéntica a la región marco de la SEQ ID NO: 12.

Además, se describe un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a FcRn que comprende una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera comprende la región marco de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, o la SEQ ID NO: 24, o una región marco que es al menos 95 % idéntica a la región marco de la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, o la SEQ ID NO: 24. La región variable de cadena ligera puede comprender la región marco de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22, o una región marco que es al menos 95 % idéntica a la región marco de la SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades de los anticuerpos descritos en la presente, el anticuerpo tiene el isotipo IgG4. En algunas modalidades, el anticuerpo contiene modificaciones S241P en las cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo carece de lisinas C-terminales en las cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo contiene modificaciones S241P en las cadenas pesadas y carece de lisinas C-terminales en las cadenas pesadas.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente es un scFv, Fv, Fab', Fab, $F(ab')_2$ o diacuerpo.

Además, en la presente se describe un anticuerpo que compite o bloquea de manera cruzada un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une al FcRn descrito en la presente.

Además, en la presente descripción se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno contra FcRn descrito en la presente. Además, en la presente descripción se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno contra FcRn descrito en la presente. Además, en la presente descripción se proporciona una célula huésped procariota o eucariota que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno contra FcRn descrito en la presente. Además, en la presente descripción se proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno contra FcRn descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

Además, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en la inhibición de la interacción entre FcRn y albúmina que comprende poner en contacto FcRn con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

Además, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en la reducción de los niveles de albúmina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno eficaz para reducir los niveles de albúmina. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano.

Además, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en la reducción de los niveles de toxinas unidas a albúmina en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno eficaz para reducir los niveles de toxinas unidas a la albúmina. En algunas modalidades, la toxina unida a la albúmina puede ser exógena o endógena. En algunas modalidades, la toxina unida a la albúmina es cobre, hematina, ácido graso de cadena larga, zinc, bilirrubina, tiroxina, eicosanoides, triptófano, vitamina D3, ácidos biliares, calcio, magnesio, cloruro, indometacina, azul de bromofenol, salicilato, warfarina, fenilbutazona, digoxina, furosemida, fenitoína, clorpropamida, bencilpenicilina, azul de Evans, diazepam, ibuprofeno, naproxeno, clofibrato, clorpromazina, imipramina, quinidina, ricina, amiodarona o acetaminofeno. En algunas modalidades, la toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno. En algunas modalidades, una cantidad con eficacia terapéutica de un anticuerpo o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción pueden administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas. En algunas modalidades, las terapias conocidas pueden ser el estándar de atención. Por ejemplo, en modalidades en donde la toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno, el uso puede comprender además la administración simultánea, separada o secuencial de N-acetilcisteína.

Además, en la presente se describen métodos para evitar, tratar, inhibir o reducir la exposición a una toxina en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente. La toxina unida a la albúmina puede ser exógena o endógena. La toxina puede ser cobre, hematina, ácido graso de cadena larga, zinc, bilirrubina, tiroxina, eicosanoides, triptófano, vitamina D3, ácidos biliares, calcio, magnesio, cloruro, indometacina, azul de bromofenol, salicilato, warfarina, fenilbutazona, digoxina, furosemida, fenitoína, clorpropamida, bencilpenicilina, azul de Evans, diazepam, ibuprofeno, naproxeno, clofibrato, clorpromazina, imipramina, quinidina, ricina, amiodarona o acetaminofeno. La toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno. Una cantidad con eficacia terapéutica de un anticuerpo o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción puede administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas. Las terapias conocidas pueden ser el estándar de atención. En ejemplos en donde la toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno, el método puede comprender además la administración simultánea, separada o secuencial de N-acetilcisteína.

Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para evitar o tratar una afección médica asociada con la toxicidad de la albúmina, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente. En algunas modalidades, la afección médica es una enfermedad vascular periférica y coronaria aterosclerótica. En algunas modalidades, la afección médica es una complicación vasculopática diabética. En algunas modalidades, la afección médica es la enfermedad de Alzheimer. En algunas modalidades, la afección médica es una lesión cerebral traumática. En algunas modalidades, la afección médica es diabetes mellitus. En algunas modalidades, la afección médica es insuficiencia renal en etapa terminal. En algunas modalidades, una cantidad con eficacia terapéutica de un anticuerpo o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción pueden administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas. En algunas modalidades, los otros agentes, fármacos u hormonas pueden ser terapias conocidas para la afección médica respectiva. En algunas modalidades, las terapias conocidas pueden ser el estándar de atención.

Además, en la presente descripción se proporciona un método para promover la degradación de la albúmina endógena antes de la administración de un agente terapéutico a base de albúmina que comprende administrar un anticuerpo anti-FcRn o un fragmento de este que es específico para el sitio de unión a la albúmina de FcRn a un sujeto que necesita tratamiento con el agente terapéutico a base de albúmina antes de administrar el agente terapéutico a base de albúmina.

Además, en la presente descripción se proporciona un método para promover la degradación de un agente terapéutico a base de albúmina exógena que se ha administrado a un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FcRn o un fragmento de este que es específico para el sitio de unión a la albúmina de FcRn.

En algunas modalidades, el método comprende además la etapa de administrar el agente terapéutico a base de albúmina al sujeto. En algunas modalidades, se mejora la farmacocinética o farmacodinamia del agente terapéutico a base de albúmina.

Breve descripción de las figuras

La patente o el expediente de solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La oficina proporcionará copias de esta patente o solicitud de patente publicada con dibujo(s) en color, previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de las variantes de la cadena pesada humanizada (V_H1, V_H1, y V_H4). Las variantes se basan en secuencias de dominio variable de cadena pesada humana y están alineadas para mostrar cambios en los aminoácidos incorporados en ciertas posiciones para minimizar la inmunogenicidad potencial. Se subrayan los residuos de aminoácidos que varían entre los marcos humanizados. Las CDR de Kabat están encerradas en recuadros.

La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos de variantes de cadena ligera humanizadas (V_K1-V_K4). Las variantes se basan en secuencias de dominio variable de cadena ligera humana y están alineadas para mostrar cambios en los aminoácidos incorporados en ciertas posiciones para minimizar la inmunogenicidad potencial. Se subrayan los residuos de aminoácidos que varían entre los marcos humanizados. Las CDR de Kabat están encerradas en recuadros.

La Figura 3 muestra una comparación de los ELISA competitivos a pH 6,0 y pH 7,4. El scFv parental se muestra en el centro. Los scFv de interés para un análisis adicional se destacan mediante el cuadro.

La Figura 4 muestra el ensayo ELISA competitivo anti-FcRn de anticuerpos anti-FcRn humanizados con maduración de la afinidad a (a) pH 7,4 o (b) pH 6,0. Las IgG se expresaron transitoriamente en células HEK. Se evaluó una serie de diluciones de variantes anti-FcRn humanizadas con maduración de la afinidad contra una concentración fija de parental murino biotinilado para la unión a FcRn humano recombinante a pH 7,4 o pH 6,0. El parental murino biotinilado unido se detectó mediante el uso de estreptavidina-HRP y sustrato TMB.

La Figura 5 muestra el ensayo ELISA competitivo anti-FcRn de anticuerpos anti-FcRn humanizados con maduración de la afinidad a pH 6,0. Las IgG se expresaron de manera estable en células NS0. Se evaluó una serie de diluciones de variantes anti-FcRn humanizadas con maduración de la afinidad contra una concentración fija de parental murino biotinilado para la unión a FcRn humano recombinante a pH 6,0. El parental murino biotinilado unido se detectó mediante el uso de estreptavidina-HRP y sustrato TMB.

La Figura 6 muestra el ensayo ELISA competitivo anti-FcRn de anticuerpos anti-FcRn humanizados con maduración de la afinidad a pH 7,4. Las IgG se expresaron de manera estable en células NS0. Se evaluó una serie de diluciones de variantes de anti-FcRn humanizados con maduración de la afinidad contra una concentración fija de parental murino biotinilado para la unión a FcRn humano recombinante a pH 7,4. El parental murino biotinilado unido se detectó mediante el uso de estreptavidina-HRP y sustrato TMB.

La Figura 7 muestra la unión de los mAb a FcRn humano a pH 7,4 y pH 6,0. Sensorgramas representativos que muestran la unión de cantidades tituladas de hFcRn inyectadas sobre los mAb inmovilizados (A) SYNT002h (parental humanizado V_H1/V_K1), (B) SYNT002-3 (G15_C3/V_K3), (C) SYNT002-8 (G47_B10/V_K3), (D) SYNT002-16 (G50_C10/V_K3), (E) SYNT002-17 (G54_D11/V_K3), y (F) SYNT002-21 (G49_H9.3/V_K3).

La Figura 8A muestra los resultados del estudio de SYNT002-8 (G47_B10/V_K3) y SYNT002-16 (G50_C10/V_K3) graficados como el porcentaje medio de albúmina restante basado en los valores de referencia de 24 horas (± error estándar) en los momentos indicados.

La Figura 8B muestra que SYNT002-8 (G47_B10/V_K3) aumentó eficazmente el catabolismo de la albúmina de una manera dependiente de la dosis. Los resultados se presentan como el $\log_{10}$ del porcentaje medio (± SEM) de

albúmina humana restante en los momentos indicados en comparación con los valores de referencia de 24 horas.

La Figura 9 muestra los niveles de ALT en suero seis y ocho horas después de la administración subnivel de APAP en ratones *Fcgrt*^{TG} que recibieron PCS, NAC (140 mg/kg), SYNT002-8 (G47_B10/V$_K$3) (10 mg/kg) o IgG4 control de isotipo (10 mg/kg) dos horas después de la administración de APAP.

Descripción detallada

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos y proteínas de unión que se unen a FcRn como se define en las reivindicaciones. Más particularmente, los anticuerpos se unen a un epítopo de FcRn que se superpone al sitio de unión para la albúmina. En consecuencia, los anticuerpos modulan las funciones mediadas por FcRn, tales como la unión de FcRn a la albúmina, la protección de la albúmina contra la degradación y la prolongación de la vida media de los compuestos unidos a la albúmina. En otro aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica al anticuerpo contra FcRn o su porción de unión a antígeno. En otro aspecto, se proporciona una composición adecuada para la administración a un sujeto que comprende el anticuerpo contra FcRn o su porción de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente inhiben la unión de la albúmina a FcRn humano pero no inhiben la unión de IgG humana a FcRn humano. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente disminuyen la vida media sérica de la albúmina pero no disminuyen la vida media sérica de la IgG humana.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para modular la interacción entre FcRn y la albúmina. Por ejemplo, mediante la reducción de la unión de la albúmina a FcRn, los anticuerpos o sus porciones de unión a antígenos, como se define en las reivindicaciones, pueden usarse para reducir la vida media de la albúmina circulante y tratar o evitar exposiciones tóxicas agudas y crónicas. Se conoce que la albúmina se une a una amplia gama de compuestos y moléculas, por ejemplo, cobre, hematina, ácido graso de cadena larga, zinc, bilirrubina, tiroxina, eicosanoides, triptófano, vitamina D3, ácidos biliares, calcio, magnesio, cloruro, indometacina, azul de bromofenol, salicilato, warfarina, fenilbutazona, digoxina, furosemida, fenitoína, clorpropamida, bencilpenicilina, azul de Evans, diazepam, ibuprofeno, naproxeno, clofibrato, clorpromazina, imipramina y quinidina (véase, por ejemplo, Varshney y otros, Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be optimized. Chirality. 2010 (22): 77-87). Además, se conoce que la ricina se une a la albúmina (Blome y Schengrund, Toxicon. 2008 51(7): 1214-24). Además, se ha descubierto que el acetaminofeno se une a la albúmina de suero humano (Damsten y otros, Drug Metab Dispos. 2007 35(8): 1408-17). La excreción de dichos compuestos y moléculas sería ventajosa en el tratamiento de diversas afecciones que incluyen, sin limitación, sobredosis tóxicas de una variedad de fármacos (por ejemplo, medicamentos conjugados con albúmina y proteínas de fusión), toxicidad por metales pesados, sobrecarga bacteriana, sepsis bacteriana y una variedad de otras afecciones.

De manera similar, los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción pueden usarse para reducir la vida media de la albúmina circulante para el tratamiento de afecciones médicas asociadas con la toxicidad de la albúmina o para las que se ha indicado que son beneficiosos niveles más bajos. Por ejemplo, la albúmina se ha implicado en la enfermedad vascular periférica y coronaria aterosclerótica (Song, Atherosclerosis 2012), complicaciones vasculopáticas diabéticas (Kim, Diab Metab J 2012; Murea, Am J Nephrol 2012), enfermedad de Alzheimer (Byun, PLoS One 2012), y lesión cerebral traumática (The SAFE Study Investigators, N Engl J Med 2007). La reducción de la albúmina circulante puede ser útil además en el tratamiento de la diabetes mellitus, insuficiencia renal en etapa terminal y otras enfermedades o trastornos.

El FcRn, conocido además como receptor Fc neonatal, es un receptor Fc de membrana integral para la albúmina. El FcRn es un heterodímero de una cadena alfa unida a la membrana (núm. de acceso de GenBank NM004107) y microglobulina β2 soluble (β2m) (núm. de acceso de GenBank NM004048) y está relacionado estructuralmente con moléculas de MHC de clase I. El FcRn regula las concentraciones de albúmina tras unirse a la albúmina endocitada y protegerla de la degradación en el compartimento lisosómico, y transportar la albúmina a la superficie celular para su liberación a pH extracelular neutro. A través de este mecanismo, FcRn es responsable de la vida media sérica prolongada de la albúmina. Por consiguiente, el bloqueo específico de la interacción FcRn-albúmina puede usarse para promover la degradación de toxinas patógenas unidas a albúmina.

Los anticuerpos pueden derivarse de un anticuerpo murino que se une específicamente a FcRn y bloquea la unión de FcRn a la albúmina pero no se une sustancialmente al sitio de unión IgG-Fc de FcRn. Los anticuerpos tienen mejoras sustanciales en la afinidad de unión por FcRn a pH 7,4 y pH 6,0 y, por lo tanto, bloquean la unión de la albúmina a FcRn en condiciones fisiológicas y ácidas. Los anticuerpos son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Los anticuerpos comprenden una o más CDR con maduración de la afinidad. El procedimiento de maduración de la afinidad proporciona anticuerpos que se unen con alta afinidad a FcRn en el intervalo de pH crítico de 6,0 a 7,4. Por tanto, los anticuerpos bloquean eficazmente la unión de la albúmina una vez internalizada en el entorno ácido del endosoma.

Los anticuerpos mejorados presentan además marcos humanizados para reducir la inmunogenicidad. Como se describe en la presente, las CDR de un anticuerpo específico de FcRn pueden ubicarse en marcos obtenidos a partir de un anticuerpo humano. Como se describe en la presente, las CDR de un anticuerpo específico de FcRn pueden ubicarse en marcos que son un compuesto de dos o más anticuerpos humanos. Como se describe en la presente, los residuos marco expuestos en la superficie de un anticuerpo específico de FcRn pueden reemplazarse con residuos marco de un anticuerpo humano. Como se describe en la presente, los marcos pueden seleccionarse para minimizar la presencia de secuencias de aminoácidos que se predice que son epítopos de células T en un amplio rango de población. Las CDR pueden ubicarse además en marcos murinos enlazados a regiones constantes humanas (es decir, anticuerpos quiméricos).

Como se describe adicionalmente en la presente, para la maduración de la afinidad, las regiones CDR3 del dominio variable de la cadena pesada se mutaron y se seleccionaron en forma scFv a pH 6,0 y pH 7,4. La variación de la secuencia de aminoácidos se introdujo en la región CDR3H de la cadena pesada en las posiciones de aminoácidos 94-100 (a.a. 95-100 de CDR3H y a.a. 94 de FW3) mediante el uso de un oligonucleótido que comprende la secuencia ARGBNSVVSBNCVNCNVCRSC (SEQ ID NO: 41) que proporcionó aminoácidos seleccionados en cada posición de la siguiente manera: a.a. 94: K, R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, L, P, Q, R, S, V, W, Y; a.a. 96: A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T; a.a. 97: A, C, D, F, G, H, L, P, R, S, T, V, Y; a.a. 98: A, D, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V; a.a. 99: A, C, D, G, H, N, P, R, S, T, Y; a.a. 100: A, G, S, T. La variación de la secuencia de aminoácidos se introdujo en la región CDR3H de la cadena pesada en las posiciones de los aminoácidos 94-99 (a.a. 95-99 de CDR3H y a.a. 94 de FW3) mediante el uso de un oligonucleótido que comprende la secuencia AGGNNSNNSNNSNNSRSC (SEQ ID NO: 42) que proporcionó aminoácidos seleccionados en cada posición de la siguiente manera: a.a. 94: R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 96: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 97: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 98: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 99: A, G, S, T.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, esto condujo a varias variantes de CDR3H que conferían mejoras sustanciales en la afinidad de unión de FcRn. La inspección de las variantes obtenidas en comparación con la variabilidad introducida en la biblioteca CDR3H indica ciertas posiciones en las que los aminoácidos permanecieron relativamente sin cambios y otras en las que se podría introducir variación y dar como resultado una unión mejorada. Por consiguiente, en la presente descripción se describe un anticuerpo o una porción de unión de este que se une a FcRn, en donde la cadena pesada comprende CDR3H, que comprende ciertos aminoácidos que pueden variarse. En una de tales modalidades, CDR3H comprende X_1ESTTX_2, en donde X_1 es A, o L; y X_2 es T, o R; (SEQ ID NO: 43). Como se describe adicionalmente en la presente, la CDR3H de cadena pesada puede ser X_1ESTTX_2VGDY, en donde X_1 es A o L; y X_2 es T, o R (SEQ ID NO: 44). Como se describe adicionalmente en la presente, la CDR3H de cadena pesada puede comprender X_1ESTTX_2, en donde X_1 es G, A o L; y X_2 es T, o R (SEQ ID NO: 45). Como se describe adicionalmente en la presente, la CDR3H de cadena pesada puede ser X_1ESTTX_2VGDY, en donde X_1 es G, A o L; y X_2 es T, o R (SEQ ID NO: 46). Como se describe en la presente, la CDR3H de cadena pesada puede comprender $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, en donde X_1 es G, A, F o L; X_2 es E, A o D; X_3 es S, T, o A; X_4 es T, L, P o V; X_5 es T, S o A; y X_6 es T o A (SEQ ID NO: 47). Como se describe en la presente, la CDR3H de cadena pesada es $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$VGDY, en donde X_1 puede ser G, A, F o L; X_2 es E, A o D; X_3 es S, T, o A; X_4 es T, L, P o V; X_5 es T, S o A; y X_6 es T o A (SEQ ID NO: 48).

Como se describe en la presente, CDR3H puede ser GESTTTVGDY (SEQ ID NO: 25), AESTTTVGDY (SEQ ID NO: 27), FSSLSTVGDY (SEQ ID NO: 29) o LESTTAVGDY (SEQ ID NO: 31). Como se describe en la presente, CDR3H puede ser FDTPATVGDY (SEQ ID NO: 33), FDTPSTVGDY (SEQ ID NO: 35), FDSLSTVGDY (SEQ ID NO: 37) o LEAVSAVGDY (SEQ ID NO: 39). Como se describe en la presente, el aminoácido en la posición 103 del dominio variable de la cadena pesada puede ser triptófano. Como se describe en la presente, el aminoácido en la posición 103 del dominio variable de la cadena pesada puede ser arginina.

Cuando CDR3H es como se establece anteriormente, CDR1H puede establecerse por la SEQ ID NO: 2, y CDR2H se establece por la SEQ ID NO: 4.

Se desarrollaron varios marcos de cadena pesada y ligera. Los marcos humanizados se ensamblaron a partir de secuencias de dominios variables humanos, con vistas a minimizar los epítopos de células T inmunogénicas. Se ilustran tres de dichos marcos de cadena pesada humanizados y cuatro de dichos marcos de cadena ligera humanizados: V_H1 (SEQ ID NO: 12); V_H3 (SEQ ID NO: 14); V_H4 (SEQ ID NO: 16); V_K1 (SEQ ID NO: 18); V_K2 (SEQ ID NO 20); V_K3 (SEQ ID NO: 22); y V_K4 (SEQ ID NO: 24). Las secuencias de oligonucleótidos correspondientes para estos marcos humanizados ilustrativos se establecen mediante: la SEQ ID NO: 11 (V_H1), la SEQ ID NO: 13 (V_H3); la SEQ ID NO: 15 (V_H4); la SEQ ID NO: 17 (V_K1); la SEQ ID NO: 19 (V_K2); la SEQ ID NO: 21 (V_K3); y la SEQ ID NO: 23 (V_K4). En las secuencias de dominio variable de cadena pesada proporcionadas en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 18, los aminoácidos CDR1H, CDR2H y CDR3H se representan como "Xaa". Las secuencias de aminoácidos de CDR1H y CDR2H son las que se establecen en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente. Una secuencia de oligonucleótidos correspondiente para CDR1H se establece por la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de oligonucleótidos correspondiente para CDR2H se establece por la SEQ ID NO: 3. En las secuencias de dominio variable de cadena ligera proporcionadas en la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24, se especifica un aminoácido particular en todas las posiciones. Las secuencias

de aminoácidos de CDR1L son como se establece en la SEQ ID NO: 6, CDR2L como se establece en la SEQ ID NO: 8 y CDR3L como se establece en la SEQ ID NO: 10. Las secuencias de oligonucleótidos correspondientes son como se establece por: la SEQ ID NO: 5 (CDR1L); la SEQ ID NO: 7 (CDR2L); y la SEQ ID NO: 9 (CDR3L). Las ubicaciones de FW y CDR en las cadenas pesada y ligera serán evidentes además en la Figura 1 y la Figura 2, respectivamente.

La Tabla 1 proporciona ejemplos no limitantes de dominios variables de CDR y cadena ligera y pesada de anticuerpo de unión a FcRn humanizado, con maduración de la afinidad. Como se describe en la presente, los dominios variables se seleccionaron para mejorar la unión a pH 6,0 y pH 7,4 y demuestran una unión sustancialmente mejorada con respecto al anticuerpo murino parental.

Tabla 1 - Secuencias de aminoácidos de anticuerpos por SEQ ID NO

	CDR1H	CDR2H	CDR3H	V_H
G15_C3 V_H1	2	4	25	26
G47_B10 V_H1	2	4	27	28
G47_H6 V_H1	2	4	29	30
G50_C10 V_H1	2	4	31	32
G54_D11 V_H1	2	4	33	34
G52_G9 V_H1	2	4	35	36
G49_H9.3 V_H1	2	4	37	38
G49_H9.5 V_H1	2	4	39	40

Las CDR3 de cadena pesada con maduración de la afinidad pueden combinarse con una CDR1 de cadena pesada (por ejemplo, una CDR1 que tiene la SEQ ID NO: 2) y/o una CDR2 de cadena pesada (por ejemplo, una CDR2 que tiene la SEQ ID NO: 4).

Como se describe en los ejemplos a continuación, varios dominios variables de anticuerpos ilustrativos de la presente descripción se basan en un anticuerpo murino y contienen CDR con maduración de la afinidad, y ciertas modalidades presentan además FW humanizados. Cualquier dominio variable de cadena pesada descrito en la Tabla 1 puede expresarse conjuntamente con cualquier cadena ligera descrita para crear un anticuerpo anti-FcRn funcional. Además, un dominio variable de cadena pesada con maduración de la afinidad puede aparearse con un dominio variable de cadena ligera con maduración de la afinidad humanizado descrito en la presente, y un dominio variable de cadena ligera con maduración de la afinidad puede aparearse con un dominio variable de cadena pesada humanizado sin maduración de la afinidad. El dominio variable de cadena pesada con maduración de la afinidad puede aparearse con un dominio variable de cadena ligera humanizado. Además, la Tabla 1 expone las CDR de cadena pesada en V_H1. Las CDR de cadena pesada son compatibles además, por ejemplo, con los marcos V_H3 y V_H4 descritos en la presente (véase la Figura 1). Como se usa en la presente descripción, las designaciones V_H1, V_H3, V_H4, V_K1, V_K2, V_K3 y V_K4 se refieren a marcos humanizados ilustrativos descritos en la presente, y no son referencias de las familias del gen de la línea germinal humana. Resultará evidente que cualquier dominio variable de cadena pesada o cadena ligera descrito en la presente puede combinarse con una biblioteca de dominios variables complementarios y seleccionarse para identificar nuevos anticuerpos que tengan características de unión mejoradas o alteradas.

En la presente descripción se describen anticuerpos y porciones de unión a antígeno que son similares, pero no idénticos, a los descritos en la Tabla 1. Los anticuerpos pueden tener una o más sustituciones, deleciones, inserciones y/o adiciones de aminoácidos. Como se describe en la presente, un anticuerpo contra FcRn comprende un dominio variable de cadena pesada que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a un dominio variable de cadena pesada establecido en la Tabla 1.

Como se describe en la presente, un anticuerpo contra FcRn puede contener un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR, es decir, CDR1H, CDR2H y CDR3H, establecidas en la Tabla 1 y un marco (es decir, FW1, FW3 y FW4) de V_H1, V_H3 o V_H4 o un marco que es al menos 85 %, 90 % o 95 % idéntico a un marco de V_H1, V_H3, o V_H4. Como se describe en la presente, un anticuerpo contra FcRn puede contener un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR establecidas en la Tabla 1 y marcos tales que la secuencia del dominio variable de cadena pesada sea al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 % idéntico a un dominio variable establecido en la Tabla 1.

Como se describe en la presente, un anticuerpo contra FcRn puede contener un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR, es decir, CDR1H, CDR2H y CDR3H, establecidas en la Tabla 1 y un marco (es decir, FW1, FW3 y FW4) de V_H1, V_H3, o V_H4 o un marco que es al menos 85 %, 90 % o 95 % idéntico a un marco de V_H1, V_H3, o V_H4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende V_K1, V_K2, V_K3, o V_K4 o una secuencia que es al menos 85 %, 90 % o 95 % idéntica a V_K1, V_K2, V_K3, o V_K4.

La "identidad" se refiere al número o porcentaje de posiciones idénticas compartidas por dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, que tiene en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

Cuando se describe que una secuencia de aminoácidos es al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 % idéntica a otra secuencia de aminoácidos, las secuencias de aminoácidos pueden diferir por sustituciones conservadoras (que incluyen donde todas las sustituciones son sustituciones conservadoras).

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse, en algunos casos, mediante la selección de sustituciones que no difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto peptídico en el área de la sustitución, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo; o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Por ejemplo, los residuos de origen natural pueden dividirse en grupos basado en las propiedades de la cadena lateral; (1) aminoácidos hidrófobos (metionina, alanina, valina, leucina e isoleucina); (2) aminoácidos hidrófilos neutros (cisteína, serina y treonina); (3) aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico); (4) aminoácidos básicos (asparagina, glutamina, histidina, lisina y arginina); (5) aminoácidos que influyen en la orientación de la cadena (glicina y prolina); y (6) aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina). Las sustituciones realizadas dentro de estos grupos pueden considerarse sustituciones conservadoras. Los ejemplos de sustituciones incluyen, sin limitación, la sustitución de valina por alanina, lisina por arginina, glutamina por asparagina, ácido glutámico por ácido aspártico, serina por cisteína, asparagina por glutamina, ácido aspártico por ácido glutámico, prolina por glicina, arginina por histidina, leucina por isoleucina, isoleucina por leucina, arginina por lisina, leucina por metionina, leucina por fenilalanina, glicina por prolina, treonina por serina, serina por treonina, tirosina por triptófano, fenilalanina por tirosina y/o leucina por valina.

Los métodos y programas de computadora para determinar la similitud de secuencias están disponibles públicamente, lo que incluye, pero no se limita al paquete de programas GCG (Devereux y otros, Nucleic Acids Research 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215: 403 (1990) y el programa ALIGN (versión 2.0). El algoritmo de Smith Waterman que se conoce bien puede usarse además para determinar la similitud. El programa BLAST está disponible públicamente a partir de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, y otros, NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; BLAST 2.0 en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). En comparación de secuencias, estos métodos tienen en cuenta varias sustituciones, deleciones y otras modificaciones.

Como se usa en la presente descripción, el término "Regiones determinantes de complementariedad" (CDR, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión al antígeno. Cada dominio variable tiene típicamente tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede comprender residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" como define Kabat (es decir, aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada. Asimismo, los "marcos" (FW) comprenden los aminoácidos 1-23 (FW1), 35-49 (FW2), 57-88 (FW3) y 98-107 (FW4) en el dominio variable de cadena ligera y 1-30 (FW1), 36-49 (FW2), 66-94 (FW3) y 103-113 (FW4) en el dominio variable de la cadena pesada y tienen en cuenta el sistema de numeración de Kabat (Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1987, 1991)).

Las designaciones de residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat correspondiente a un acortamiento o inserción en un componente estructural, ya sea una región marco o determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Como se usa en la presente descripción, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas ligeras y pesadas de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y regiones marco (FR). V_H se refiere al dominio variable de la cadena pesada. V_L se refiere al dominio variable de la cadena ligera.

Los anticuerpos son proteínas que reconocen y se unen a un antígeno o sustancia específica. En modalidades preferidas, los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción se unen a FcRn al menos tan fuertemente como el ligando natural (es decir, la albúmina). La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo (Kd), mide la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión de anticuerpo. La afinidad de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse mediante el uso de una medición de resonancia de energía de plasmón superficial adecuada. Dicha medida podría ser el ensayo BIACORE® descrito en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2005/012359 y en otras partes de la presente descripción. Otros métodos para determinar la afinidad incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas o ensayos de competición tales como radioinmunoensayos.

La avidez es la medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo y su antígeno. La avidez está relacionada tanto con la afinidad entre un determinante antigénico y un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo, como con el número de sitios de unión (valencia) por anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo monovalente (por ejemplo, Fab o scFv) tiene un sitio de unión para un epítopo particular. Un anticuerpo IgG tiene dos sitios de unión al antígeno. Los valores típicos de K (el recíproco de la constante de disociación K_d) son de 10^5 a 10^{11} litros/mol. Cualquier K más débil que 10^4 litros/mol se considera para indicar la unión que es no específica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno descritos en la presente se unen a la porción de unión a la albúmina del FcRn humano con una K_d de 10^5 a 10^{12} litros/mol, 10^6 a 10^{12} litros/mol, 10^7 a 10^{12} litros/mol, 10^8 a 10^{12} litros/mol, 10^9 a 10^{12} litros/mol, 10^{10} a 10^{12} litros/mol, o 10^{11} a 10^{12} litros/mol. En otras modalidades, los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno descritos en la presente se unen a la porción de unión a la albúmina del FcRn humano con una K_d de 10^5 a 10^{11} litros/mol, 10^6 a 10^{11} litros/mol, 10^7 a 10^{11} litros/mol, 10^8 a 10^{11} litros/mol, 10^9 a 10^{11} litros/mol, o 10^{10} a 10^{11} litros/mol. En otras modalidades, los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno descritos en la presente se unen a la porción de unión a la albúmina del FcRn humano con una K_d de 10^5 a 10^{10} litros/mol, 10^6 a 10^{10} litros/mol, 10^7 a 10^{10} litros/mol, 10^8 a 10^{10} litros/mol, o 10^9 a 10^{10} litros/mol. En otras modalidades, los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno descritos en la presente se unen a la porción de unión a la albúmina del FcRn humano con una K_d de 10^5 a 10^8 litros/mol, 10^6 a 10^8 litros/mol, o 10^7 a 10^8 litros/mol.

Con el fin de minimizar la inmunogenicidad cuando se administran a un ser humano, los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción incluyen preferentemente dominios constantes humanos. Por tanto, los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo o subtipo, que incluye pero no se limita a, IgG1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgG_4, IgM, IgA, IgD, o IgE. La clase de anticuerpos puede seleccionarse para optimizar las funciones efectoras *(por ejemplo,* para aumentar o reducir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)). En ciertas modalidades, la región constante (es decir, C_H1, C_H2, C_H3 y/o la región bisagra) se modifica, por ejemplo, para aumentar o disminuir la unión a un receptor Fc. En ciertas modalidades, el dominio constante se modifica para promover o estabilizar la unión cadena pesada-cadena pesada. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG_4 y la región bisagra de las cadenas pesadas se modifica tras cambiar la serina en la posición 241 por prolina, lo que conduce a una vida media sérica prolongada (Angal y otros, 1993, Mol. Immunol. 30: 105-108). En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG_4 y las lisinas C-terminales en la posición 478 de las cadenas pesadas se eliminan. En algunas modalidades, el anticuerpo IgG_4 tiene las modificaciones S241P y carece de lisinas C-terminales.

En ciertas modalidades, se proporcionan fragmentos de anticuerpos de unión a FcRn. Un Fv es el fragmento más pequeño que contiene un dominio variable completo de cadena ligera y pesada, incluidos los seis bucles hipervariables (CDR). Al carecer de dominios constantes, los dominios variables se asocian de manera no covalente. Las cadenas pesada y ligera pueden conectarse en una única cadena polipeptídica (un "Fv monocatenario" o "scFv") mediante el uso de un enlazador que permite que los dominios V_H y V_L se asocien para formar un sitio de unión al antígeno. Véase, por ejemplo, Bird y otros, 1988, Science 242: 423 y Huston y otros, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879. En una modalidad, el enlazador es $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_3$. Dado que los fragmentos scFv carecen de los dominios constantes de los anticuerpos completos, son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos. Los fragmentos scFv además están libres de interacciones normales de dominio constante de cadena pesada con otras moléculas biológicas que pueden desearse en ciertas modalidades.

Los "anticuerpos", como se usa en la presente descripción, se refieren a monómeros así como a multímeros y fragmentos de unión. Pueden usarse anticuerpos intactos, lo que incluye multímeros, o fragmentos de anticuerpos que portan regiones de anticuerpos de unión a antígeno. Las regiones de unión a antígeno incluyen, sin limitación, fragmentos Fv, scFv, Fab, Fab' y $F(ab')_2$. Los métodos para preparar fragmentos de anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab monovalentes, que carecen de la región bisagra de la cadena pesada, pueden prepararse a partir de inmunoglobulina completa mediante digestión proteolítica con papaína. Los fragmentos $F(ab')_2$ bivalentes, que retienen la región bisagra de la cadena pesada, pueden prepararse mediante digestión proteolítica con pepsina.

Además, pueden usarse fragmentos de un anticuerpo que contienen V_H, V_L y opcionalmente C_L, C_H1 u otros dominios constantes. Dichos fragmentos pueden producirse además de manera recombinante. En la técnica se conocen muchos otros fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos útiles e incluyen, sin limitación, diacuerpos, triacuerpos, anticuerpos de dominio único y otras formas monovalentes y multivalentes.

Se proporcionan además proteínas multivalentes de unión a antígenos, que pueden estar, sin limitación, en forma de anticuerpos, sus fragmentos de unión a antígenos y proteínas que comprenden todas o parte de las porciones de unión a antígenos de los anticuerpos. Las proteínas multivalentes de unión a antígenos pueden ser monoespecíficas, biespecíficas o multiespecíficas. El término especificidad se refiere al número de diferentes tipos de determinantes antigénicos a los que puede unirse una molécula particular. Si una molécula de inmunoglobulina se une a un solo tipo de determinante antigénico, la molécula de inmunoglobulina es monoespecífica. Si la molécula de inmunoglobulina se une a diferentes tipos de determinantes antigénicos, entonces la molécula de inmunoglobulina es multiespecífica.

En una modalidad, un anticuerpo monocatenario multivalente incluye un fragmento de cadena ligera variable enlazado a un fragmento de cadena pesada variable (similar a un scFv), que además está enlazado por otro péptido enlazador al menos a otro dominio de unión a antígeno. Típicamente, el péptido enlazador está compuesto por aproximadamente quince residuos de aminoácidos. En una modalidad preferida, el número de dominios V_L y V_H es equivalente. Por ejemplo, un anticuerpo monocatenario bivalente puede representarse como sigue: V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_3-V_H o V_L-L_1-V_H-L_2-V_H-L_3-V_L o V_H-L_1-V_L-L_2-V_H-L_3-V_L o V_H-L_1-V_L-L_2-V_L-L_3-V_H. Los anticuerpos monocatenarios multivalentes que son trivalentes o mayores tienen uno o más fragmentos de anticuerpo unidos a un anticuerpo monocatenario bivalente mediante enlazadores peptídicos adicionales. Un ejemplo de un anticuerpo monocatenario trivalente es: V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H.

Pueden combinarse dos anticuerpos monocatenarios para formar un diacuerpo, conocido además como dímero bivalente. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea 0 404 097 o Hollinger y otros, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444. Los diacuerpos tienen dos cadenas. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio V_H conectado a un dominio V_L por un enlazador corto de aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos, por ejemplo, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser), (Gly-Gly-Gly- Gly-Ser)$_2$. Dichos enlazadores son lo suficientemente cortos para evitar el apareamiento intracatenario entre dominios de la misma cadena, lo que impulsa el apareamiento intercatenario entre dominios complementarios en cadenas diferentes y recrea dos sitios de unión a antígeno. La estructura del diacuerpo es compacta, con sitios de unión a antígeno en los extremos opuestos de la molécula.

Las variantes de la secuencia marco V_H y V_L y los anticuerpos con maduración de la afinidad pueden someterse a un ensayo preclínico ex vivo para evaluar la inmunogenicidad potencial. Uno de dichos ensayos es EPISCREEN™, que proporciona una tecnología eficaz para predecir la inmunogenicidad de las células T mediante la cuantificación de las respuestas de las células T a los agentes terapéuticos proteicos. El ensayo usa una cohorte de donantes de sangre cuidadosamente seleccionados en base a los haplotipos del MHC de clase II para representar mejor el número y la frecuencia de los alotipos HLADR expresados en la población mundial. El ensayo proporciona un método mediante el cual puede evaluarse la inmunogenicidad de proteínas completas tanto en términos de magnitud como de frecuencia de las respuestas de las células T (Jones y otros, J Interferon Cytokine Res.2004 24(9): 560-72; Jones y otros, J Thromb Haemost. 2005 3(5): 991-1000).

Los anticuerpos que compiten o bloquean de manera cruzada la unión de un anticuerpo descrito en la presente a FcRn, o que a su vez están bloqueados de manera cruzada para que no se unan a FcRn por un anticuerpo descrito en la presente, pueden usarse en los métodos de bloqueo de la actividad de FcRn descrita en la presente. En algunos casos, estos anticuerpos competidores, de bloqueo cruzado o bloqueados de manera cruzada se unen a un epítopo de FcRn que limita y/o se superpone con el epítopo unido por un anticuerpo descrito en la presente. En algunos casos, estos anticuerpos competidores, de bloqueo cruzado o bloqueados de manera cruzada son anticuerpos quiméricos, completamente humanos o humanizados que se unen a un epítopo de FcRn que es el mismo que el epítopo unido por un anticuerpo descrito en la presente.

Los anticuerpos competidores, de bloqueo cruzado y bloqueados de manera cruzada pueden identificarse mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye ELISA competitivo o ensayos BIACORE® donde la unión del anticuerpo de competencia o de bloqueo cruzado al FcRn humano evita la unión de un anticuerpo descrito en la presente o viceversa.

El anticuerpo competidor o de bloqueo cruzado puede ser un anticuerpo que bloquea la unión de la albúmina a FcRn humano y que compite o bloquea de manera cruzada la unión de un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 38 y la SEQ ID NO: 40, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24. La competencia o el bloqueo cruzado puede ser más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más de 95 %.

El anticuerpo competidor o de bloqueo cruzado puede ser un anticuerpo que bloquea la unión de la albúmina al FcRn humano y que compite o bloquea de manera cruzada la unión de un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 28 y una secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22. La competencia o el bloqueo cruzado puede ser más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más de 95 %.

El anticuerpo competidor o de bloqueo cruzado puede ser un anticuerpo que bloquea la unión de la albúmina al FcRn humano y que compite o bloquea de manera cruzada la unión de un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22. La competencia o el bloqueo cruzado puede ser más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más de 95 %.

Como se describe en la presente, el anticuerpo competidor o bloqueado de manera cruzada puede ser un anticuerpo que bloquea la unión de la albúmina al FcRn humano y cuya unión a FcRn compite o es bloqueada de manera cruzada por un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 38 y la SEQ ID NO: 40, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la

SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24. El anticuerpo competidor o bloqueado de manera cruzada puede competir o bloquearse de manera cruzada hasta más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más de 95 %.

Como se describe en la presente, el anticuerpo competidor o bloqueado de manera cruzada puede ser un anticuerpo que bloquea la unión de la albúmina a FcRn humano y cuya unión a FcRn compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 28 y una secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22. El anticuerpo competidor o bloqueado de manera cruzada puede competir o bloquearse de manera cruzada hasta más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más de 95 %.

Como se describe en la presente, el anticuerpo competidor o bloqueado de manera cruzada puede ser un anticuerpo que bloquea la unión de la albúmina al FcRn humano y cuya unión a FcRn compite o se bloquea de manera cruzada con un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22. El anticuerpo competidor o bloqueado de manera cruzada puede competir o bloquearse de manera cruzada hasta más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más de 95 %.

Como se describe en la presente, los anticuerpos competidores, de bloqueo cruzado o bloqueados de manera cruzada pueden ser quiméricos, completamente humanos o están humanizados. Como se describe en la presente, los anticuerpos competidores, de bloqueo cruzado o bloqueados de manera cruzada pueden unirse al sitio de unión de la albúmina del FcRn humano con una afinidad de 10^5 a 10^{11} litros/mol., 10^6 a 10^{11} litros/mol., 10^7 a 10^{11} litros/mol., 10^8 a 10^{11} litros/mol., 10^9 a 10^{11} litros/mol., o 10^{10} a 10^{11} litros/mol.

Además, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-FcRn y sus fragmentos funcionales, vectores, células huéspedes y sistemas de expresión como se define en las reivindicaciones. Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-FcRn y sus fragmentos funcionales pueden ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN, ADN o ARN producidos sintéticamente, o una molécula de ácido nucleico quimérico producida de manera recombinante que comprende cualquiera de esos polinucleótidos solos o en combinación. Por ejemplo, se proporciona un vector de expresión que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo anti-FcRn como se define en las reivindicaciones enlazado operativamente a secuencias de control de expresión adecuadas para la expresión en una célula huésped eucariota y/o procariota. Se han desarrollado una variedad de vectores de expresión para la síntesis eficaz de anticuerpos y fragmentos en células procariotas tales como bacterias y se han desarrollado sistemas eucariotas, que incluyen, pero no se limitan a sistemas de cultivo de levaduras y células de mamíferos. Los vectores pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los ácidos nucleicos pueden comprender la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 41, o la SEQ ID NO: 42.

Puede usarse cualquier vector de expresión adecuado. Por ejemplo, los vectores de clonación procariotas incluyen plásmidos de *E. coli,* tales como *colE1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC, pKSM* y RP4. Los vectores procariotas incluyen además derivados de ADN de fagos tales como *M13* y otros fagos de ADN monocatenarios filamentosos. Un ejemplo de vector útil en levaduras es el plásmido 2µ. Los vectores adecuados para la expresión en células de mamíferos incluyen derivados bien conocidos de SV40, adenovirus, secuencias de ADN derivadas de retrovirus y vectores lanzadera derivados de la combinación de vectores de mamíferos funcionales, como los descritos anteriormente, y plásmidos funcionales, por ejemplo, pLenti6.3/V5-DEST®, pT-Rex™-DEST31®, pGene/V5-Hisp-Gene/V5-His® (Life Technologies, Norwalk, CT).

Los vectores de expresión eucariotas adicionales se conocen en la técnica (por ejemplo, P.J. Southern y P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341 (1982); Subramani y otros, Mol. Cell. Biol., 1: 854-864 (1981); Kaufmann y Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982); Kaufmann y Sharp, Mol. Cell. Biol. 159, 601-664 (1982); Scahill y otros, "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Natl Acad. Sci. USA 80, 4654-4659 (1983); Urlaub y Chasin, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, (1980).

Los vectores de expresión pueden contener al menos una secuencia de control de la expresión que está enlazada operativamente a la secuencia o fragmento de ADN que se va a expresar. La secuencia de control se inserta en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, las regiones principales del operador y promotor del fago lambda, la región de control de la proteína de la cubierta fd, los promotores glucolíticos de levadura, por ejemplo, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levadura, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura y los promotores derivados de citomegalovirus, polioma, adenovirus, retrovirus y virus de simio, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos o SV40, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas y sus virus o combinaciones de estos. Otras secuencias de control de la expresión que pueden usarse incluyen secuencias reguladoras de ADN del gen del factor de elongación 1α del hámster chino (CHEF1) (Running Deer y Allison, 2004, Biotechnol. Prog. 20: 880-889; Patente de Estados Unidos núm. 5,888,809).

Además, se proporcionan células huéspedes recombinantes que contienen los vectores de expresión definidos en las reivindicaciones. Los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción pueden expresarse en líneas celulares distintas de los hibridomas. Los ácidos nucleicos, que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido como se describe en la presente, pueden usarse para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada.

Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan en base a un nivel de expresión alto, expresión constitutiva de la proteína de interés y contaminación mínima de las proteínas del huésped. Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión se conocen bien en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas, tales como, pero sin limitarse a, células NS0, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster bebé (BHK) y muchas otras. En algunas modalidades, la célula es una célula de mieloma, por ejemplo, SP2/0, que puede transfectarse y cultivarse en la cavidad peritoneal de un ratón donde pueden recuperarse concentraciones altas de IgG del líquido ascítico. Las células eucariotas adicionales adecuadas incluyen levaduras y otros hongos. Los huéspedes procariotas útiles incluyen, por ejemplo, *E. coli,* como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas, Bacillus,* tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces.*

Estas células huéspedes recombinantes presentes pueden usarse para producir un anticuerpo, o su porción de unión a antígeno, tras cultivar las células en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o su fragmento y purificar el anticuerpo o su fragmento a partir de la célula huésped o el medio que rodea a la célula huésped. Por tanto, se describe un método para la producción de un anticuerpo capaz de unirse a la región de unión a la albúmina de FcRn, dicho método comprende: (a) cultivar una célula huésped como se describió anteriormente; y (b) aislar dicho anticuerpo a partir de la célula huésped o el medio de cultivo de la célula huésped.

Los huéspedes transformados pueden producirse en fermentadores y cultivarse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Una vez que se alcanza el nivel deseado de expresión de los anticuerpos, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, purificación en columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente, se prefiere que los anticuerpos se purifiquen al menos a 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de pureza.

El direccionamiento del anticuerpo o fragmento expresado para su secreción en las células huéspedes recombinantes puede facilitarse mediante la inserción de una secuencia que codifica al péptido líder secretor o señal (véase, Shokri y otros, Appl Microbiol Biotechnol. 60(6): 654-64 (2003), Nielsen y otros, Prot. Ing. 10: 1-6 (1997) y von Heinje y otros, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986)) en el extremo 5' del gen de interés que codifica al anticuerpo. Estos elementos del péptido líder secretor pueden derivarse de secuencias procariotas o eucariotas. Por consiguiente, de manera adecuada, se usan péptidos líderes secretores, que son aminoácidos unidos al extremo N-terminal de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido hacia fuera del citosol de la célula huésped y su secreción al medio.

Los anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno pueden fusionarse con residuos de aminoácidos adicionales. Dichos residuos de aminoácidos pueden ser una etiqueta peptídica, quizás para facilitar el aislamiento. Además, se contemplan otros residuos de aminoácidos para la localización de los anticuerpos en órganos o tejidos específicos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o su porción de unión a antígeno se conjuga con una o más moléculas efectoras, que proporcionan alguna propiedad deseable (por ejemplo, la vida media aumentada en suero) al anticuerpo o su porción de unión al antígeno. En una modalidad particular, el anticuerpo o su porción de unión al antígeno se conjuga con polietilenglicol (PEG). El PEG puede estar unido a cualquier cadena lateral de aminoácido o grupo funcional de aminoácido terminal, por ejemplo, un grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Los métodos para unir PEG a anticuerpos se conocen en la técnica y pueden emplearse. Véanse, por ejemplo, la solicitud de patente europea EP 0948544; Solicitud de patente europea EP1090037; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC; "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, New York; or Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531-545.

Puede prepararse un anticuerpo o su porción de unión al antígeno como se establece en la presente descripción mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica al anticuerpo en un animal transgénico, de manera que el anticuerpo se exprese y pueda recuperarse. Por ejemplo, el anticuerpo puede expresarse de una manera específica del tejido que facilita la recuperación y purificación. Como se describe en la presente, un anticuerpo puede expresarse en la glándula mamaria para su secreción durante la lactancia. Los animales transgénicos, incluyen pero no se limitan a ratones, cabras y conejos.

En la presente descripción se describen métodos para identificar anticuerpos que se unen a FcRn tanto a pH ácido como a pH fisiológico y además se unen a un epítopo que compite con la unión de la albúmina a FcRn. Los métodos comprenden dos o más etapas de selección que se llevan a cabo a pH ácido (por ejemplo, pH 5,0-6,6, pH 5,8-6,4, pH 6,0-6,2 o pH 6,0). Las dos o más etapas de selección ácida se alternan con las etapas de selección llevadas a cabo a pH fisiológico (por ejemplo, pH 6,8-8,2, pH 6,8-7,6, pH 7,2-7,4 o pH 7,4).

Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender:

(a) poner en contacto una colección de anticuerpos candidatos con FcRn o una porción de este a pH 5,8-6,4 y aislar los anticuerpos que se unen a FcRn o una porción de este;
(b) poner en contacto los anticuerpos aislados de la etapa (a) con FcRn o una porción de este a pH 6,8-7,6 y aislar los anticuerpos que se unen a FcRn o una porción de este;
(c) poner en contacto los anticuerpos aislados de la etapa (b) con FcRn o una porción de este a pH 5,8-6,4 y aislar los anticuerpos que se unen a FcRn o una porción de este.
(d) evaluar los anticuerpos aislados de la etapa (c) para determinar la capacidad de bloquear la unión de la albúmina a FcRn.

Otro ejemplo comprende:

(a) proporcionar una colección de anticuerpos de unión a FcRn candidatos:
(b) poner en contacto la colección de anticuerpos de unión a FcRn candidatos con FcRn o una porción de este a pH 6,0 en condiciones tales que se formen complejos entre el FcRn o una porción de este y al menos algunos de los anticuerpos de unión a FcRn candidatos;
(c) aislar los complejos;
(d) separar los anticuerpos de unión a FcRn candidatos de los complejos aislados;
(e) poner en contacto los anticuerpos de unión a FcRn candidatos separados de la etapa (d) con FcRn o una porción de este a pH 7,4 en condiciones tales que se formen complejos entre el FcRn o una porción de este y al menos algunos de los anticuerpos de unión a FcRn candidatos;
(f) aislar los complejos formados en la etapa (e);
(g) separar los anticuerpos de unión a FcRn candidatos de los complejos aislados de la etapa (f);
(h) poner en contacto los anticuerpos de unión a FcRn candidatos separados de la etapa (g) con FcRn o una porción de este a pH 6,0 en condiciones tales que se formen complejos entre el FcRn o una porción de este y al menos algunos de los anticuerpos de unión a FcRn candidatos;
(i) aislar los complejos formados en la etapa (h);
(j) separar los anticuerpos de unión a FcRn candidatos de los complejos aislados de la etapa (i) para obtener anticuerpos que se unen a FcRn tanto a pH ácido como a pH fisiológico.
(k) evaluar los anticuerpos de unión a FcRn candidatos para determinar su capacidad para bloquear la unión de la albúmina a FcRn.

La colección de anticuerpos de unión a FcRn candidatos puede ser una biblioteca de anticuerpos o sus porciones (por ejemplo, una biblioteca de scFv presentados en fagos).

La concentración de FcRn o una porción de este puede disminuirse en cada etapa de contacto. Por ejemplo, la etapa (b) puede llevarse a cabo a una concentración de 25 nM, la etapa (e) puede llevarse a cabo a una concentración de 2,5 nM y la etapa (h) puede llevarse a cabo a una concentración de 0,25 nM.

El FcRn o una porción de este puede unirse a un soporte sólido, por ejemplo, una perla magnética. En este ejemplo, las etapas de aislamiento pueden ser simplemente la unión de los anticuerpos al FcRn o una porción de este unida al soporte sólido, por ejemplo, cuando el soporte sólido es una columna de cromatografía. Como se describe en la presente, el FcRn o una porción de este puede unirse a un resto que facilite el aislamiento de los complejos entre FcRn o una porción de este y los anticuerpos. Por ejemplo, el FcRn o una porción de este puede unirse a biotina.

Las propiedades físicas y funcionales de los anticuerpos o sus porciones de unión al antígeno, como se establece en la presente descripción, pueden determinarse mediante procedimientos de rutina. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo para bloquear la interacción FcRn-albúmina puede evaluarse mediante varios métodos. Dichos métodos pueden incluir un ensayo *in vitro que* examina la cantidad de albúmina bloqueada a partir de la unión a FcRn por el anticuerpo, un ensayo competitivo contra un anticuerpo contra FcRn conocido que compite por unirse con la albúmina, o un ensayo *in vivo que* examina la cantidad de secreción de albúmina resultante de la administración del anticuerpo.

Puede usarse cualquiera de una variedad de métodos para detectar la interrupción de la unión entre el FcRn y la albúmina, tales como los descritos en el documento US 8,232,067. Por ejemplo, pueden usarse transferencia de energía de resonancia de fluorescencia ("FRET") o métodos cromatográficos. En algunos casos, la interacción proteína-proteína puede detectarse mediante la reconstitución de los dominios de una enzima, por ejemplo, la beta-galactosidasa (véase Rossi y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8405-8410 (1997)). La evaluación de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que interrumpe la interacción entre el FcRn y la albúmina o para un

polipéptido de albúmina variante que es deficiente en la unión de FcRn puede ocurrir en un modelo animal. Por ejemplo, los métodos para medir la interrupción entre un polipéptido FcRn y un polipéptido de albúmina por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno incluyen administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un sujeto, por ejemplo, un animal experimental (por ejemplo, un mamífero) que expresa el polipéptido FcRn y el polipéptido de albúmina con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y determinar el nivel del polipéptido de albúmina en un fluido corporal del sujeto, en donde una diferencia en el nivel del polipéptido de albúmina en el fluido corporal del sujeto en presencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en comparación con el nivel del polipéptido de albúmina que estaría presente en el fluido corporal del animal en ausencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno indica que el compuesto de prueba interrumpe la interacción entre el polipéptido FcRn y el polipéptido de albúmina. Un animal para su uso de acuerdo con uno o más métodos descritos en la presente puede ser un animal transgénico. Por ejemplo, un animal para su uso de acuerdo con uno o más métodos descritos en la presente puede ser transgénico de manera que exprese FcRn, albúmina o ambos. Un animal puede ser transgénico de manera que exprese un FcRn humano, albúmina o ambos.

La región o epítopo específico de FcRn humano al que se unen los anticuerpos descritos en la presente puede identificarse mediante cualquier método de mapeo de epítopos adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos incluyen la selección de péptidos de diferentes longitudes de FcRn para la unión al anticuerpo con el fin de determinar a qué aminoácidos de FcRn se une el anticuerpo. Los péptidos pueden producirse mediante métodos bien conocidos tales como digestión proteolítica de FcRn o síntesis química. Pueden usarse técnicas como la espectrometría de masas para identificar péptidos que se unen al anticuerpo. Alternativamente, puede usarse espectroscopia de NMR o cristalografía de rayos X. Una vez identificados, los péptidos de unión pueden usarse como inmunógenos para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítopo de FcRn.

Se entiende que los anticuerpos anti-FcRn o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción, cuando se usan en un mamífero con el propósito de profilaxis o tratamiento, se administrarán en forma de una composición que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, histidina, glutamato, citrato, manitol, trehalosa, sacarosa, arginina, acetato, polisorbato 80, poloxámero 188 y similares, así como también sus combinaciones. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia de los anticuerpos.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden el anticuerpo y el portador farmacéuticamente aceptable se liofilizan.

Las composiciones que comprenden el anticuerpo y el portador farmacéuticamente aceptable pueden comprender los anticuerpos anti-FcRn o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción a diversas concentraciones. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender anticuerpos de 10 mg/ml a 200 mg/ml, 25 mg/ml a 130 mg/ml, 50 mg/ml a 125 mg/ml, 75 mg/ml a 110 mg/ml, u 80 mg/ml a 100 mg/ml. Las composiciones pueden comprender además anticuerpos a aproximadamente 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml o 150 mg/ml.

Una "toxina unida a la albúmina" se refiere a un compuesto, fármaco o molécula que se une a la albúmina. Aunque puede ser deseable en algunas circunstancias disminuir la concentración de una toxina unida a la albúmina en un sujeto, el término no se limita a un compuesto, fármaco o molécula que está marcado o se conoce comúnmente como una "toxina". El término puede incluir además toxinas tanto exógenas como endógenas. Las toxinas unidas a la albúmina pueden incluir, por ejemplo, cobre, hematina, ácido graso de cadena larga, zinc, bilirrubina, tiroxina, eicosanoides, triptófano, vitamina D3, ácidos biliares, calcio, magnesio, cloruro, indometacina, azul de bromofenol, salicilato, warfarina, fenilbutazona, digoxina, furosemida, fenitoína, clorpropamida, bencilpenicilina, azul de Evans, diazepam, ibuprofeno, naproxeno, clofibrato, clorpromazina, imipramina, quinidina, ricina, amiodarona y acetaminofeno.

En una modalidad, se proporciona un método para reducir los niveles de toxinas unidas a la albúmina en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente eficaz para reducir los niveles de toxinas unidas a albúmina. En algunas modalidades, la toxina unida a la albúmina puede ser exógena o endógena. En una modalidad, la toxina unida a la albúmina es cobre, hematina, ácido graso de cadena larga, zinc, bilirrubina, tiroxina, eicosanoides, triptófano, vitamina D3, ácidos biliares, calcio, magnesio, cloruro, indometacina, azul de bromofenol, salicilato, warfarina, fenilbutazona, digoxina, furosemida, fenitoína, clorpropamida, bencilpenicilina, azul de Evans, diazepam, ibuprofeno, naproxeno, clofibrato, clorpromazina, imipramina, quinidina, ricina, amiodarona o acetaminofeno. En algunas modalidades, la toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno. En otras modalidades en donde la toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno, el método puede comprender además la administración simultánea, separada o secuencial de N-acetilcisteína.

En otra modalidad, se proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en la reducción del nivel de una toxina unida a la albúmina en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. La toxina unida a la albúmina puede ser exógena o endógena. Las toxinas pueden ser cobre, hematina, ácido graso de cadena larga, zinc, bilirrubina, tiroxina, eicosanoides, triptófano, vitamina D3, ácidos biliares, calcio, magnesio, cloruro, indometacina, azul de bromofenol, salicilato, warfarina, fenilbutazona, digoxina, furosemida, fenitoína, clorpropamida, bencilpenicilina, azul de Evans, diazepam, ibuprofeno, naproxeno, clofibrato, clorpromazina, imipramina, quinidina, ricina, amiodarona o acetaminofeno. La toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno. En otros ejemplos en donde la toxina unida a la albúmina puede ser acetaminofeno, el método puede comprender además la administración simultánea, separada o secuencial de N-acetilcisteína.

Los métodos descritos en la presente incluyen métodos para el tratamiento de trastornos asociados con toxinas unidas a la albúmina (por ejemplo, con niveles tóxicos de dichas toxinas), por ejemplo, a partir de una sobredosis (por ejemplo, a partir de la exposición o ingestión accidental o intencional de una cantidad de una toxina por encima de un nivel considerado seguro para la salud humana o animal) o de un nivel endógeno alto de una toxina unida a la albúmina en un sujeto (por ejemplo, a partir del sujeto que produce un nivel más alto de la toxina de lo que se considera normal y seguro para la salud humana o animal).
Se proporciona aquí un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en la inhibición, la prevención o el tratamiento de una afección médica asociada con la toxicidad de la albúmina que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Como se usa en la presente descripción, "toxicidad de la albúmina" se refiere a un estado en donde la albúmina se considera nociva o perjudicial y puede dar como resultado, por ejemplo, la muerte, daño orgánico o daño neurológico. La afección médica es enfermedad vascular periférica y coronaria aterosclerótica, complicaciones vasculopáticas diabéticas, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral traumática, diabetes mellitus o insuficiencia renal en etapa terminal.

En los usos médicos descritos en la presente, una cantidad con eficacia terapéutica de un anticuerpo o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción puede administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas. En algunas modalidades, los otros agentes, fármacos u hormonas pueden ser terapias conocidas para la afección médica respectiva. En algunas modalidades, las terapias conocidas pueden ser el estándar de atención. Por ejemplo, en algunas modalidades de los usos médicos para reducir los niveles de toxinas unidas a albúmina en un sujeto o los usos médicos para evitar, tratar, inhibir o reducir la gravedad de la exposición a una toxina en un sujeto, en donde la toxina unida a la albúmina es acetaminofeno, los usos médicos pueden comprender además la administración simultánea, separada o secuencial de N-acetilcisteína.

El bloqueo del FcRn con un agente reductor de la albúmina sería beneficioso para reducir los niveles de albúmina endógena para permitir la farmacocinética y la farmacodinamia mejoradas de un agente terapéutico a base de albúmina. En este caso, el tratamiento previo con un anticuerpo anti-FcRn que es específico para el sitio de unión de la albúmina antes de la administración de dicho agente terapéutico reducirá la competencia derivada de la albúmina endógena y permitirá una mayor protección del agente terapéutico a base de albúmina administrado. En otras modalidades, el tratamiento con un anticuerpo anti-FcRn que es específico para el sitio de unión de la albúmina puede usarse para eliminar los agentes terapéuticos a base de albúmina del suero después de la administración. Esto puede ser útil cuando ya no se desee dicho tratamiento terapéutico a base de albúmina, o para reducir los efectos secundarios de una sobredosis terapéutica.

La albúmina se ha estudiado como candidato para la extensión de la vida media y el suministro intracelular dirigido de fármacos debido a su interacción con FcRn. El término "agente terapéutico a base de albúmina", como se usa en la presente descripción, se refiere a agentes terapéuticos que se asocian con la albúmina. Un agente terapéutico a base de albúmina puede asociarse con la albúmina mediante, por ejemplo, conjugación covalente, fusión genética o asociación no covalente (véase Larsen y otros, Molecular and Cellular Therapies (2016) 4:3). La asociación con la albúmina puede ocurrir antes de la administración, es decir, el agente terapéutico a base de albúmina se asocia con una molécula o moléculas de albúmina exógena. Por ejemplo, la albiglutida, fabricada por Glaxo-SmithKline y comercializada como Eperzan/Tanzeum para el tratamiento de la diabetes tipo II, es un agonista del receptor de GLP-1 desarrollado por fusión de dos repeticiones de GLP-1 humano con albúmina humana recombinante. La asociación con la albúmina puede ocurrir después de la administración del agente terapéutico, es decir, el agente terapéutico a base de albúmina se asocia con una molécula o moléculas de albúmina endógena. Por ejemplo, la insulina detemir, fabricada por Novo Nordisk y comercializada como Levemir para el tratamiento de la diabetes tipo I, es un análogo de la insulina modificado con ácido mirístico. En la inyección, el resto de ácido graso se une a la albúmina y se disocia con el tiempo, lo que mejora la biodisponibilidad y distribución. Otros ejemplos de agentes terapéuticos a base de albúmina incluyen liraglutida, ozoralizumab, MTX-HSA, adloxorrubicina, CJC-1134, Albuferon, Abraxane, ABI-008, ABI-009, ABI-010, ^{99m}Tc-Albures, ^{99m}Tc-Nanocoll y otros como se describe en Larsen y otros.

En los métodos descritos en la presente, una cantidad con eficacia terapéutica de un anticuerpo o sus porciones de unión a antígeno establecidos en la presente descripción se administra a un mamífero que lo necesita. El término "administrar", como se usa en la presente descripción, significa suministrar los anticuerpos o sus porciones de unión

a antígeno establecidos en la presente descripción a un mamífero mediante cualquier método que pueda lograr el resultado buscado. Pueden administrarse, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular. Aunque los anticuerpos o sus porciones de unión a antígenos establecidos en la presente descripción son particularmente útiles para la administración a seres humanos, pueden administrarse además a otros mamíferos. El término "mamífero", como se usa en la presente descripción, pretende incluir, pero no se limita a, seres humanos, animales de laboratorio, mascotas domésticas y animales de granja. Una "cantidad con eficacia terapéutica" significa una cantidad de anticuerpo o sus porciones de unión al antígeno establecida en la presente descripción que, cuando se administra a un mamífero, es eficaz para producir el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, en dependencia de la enfermedad, para un anticuerpo, esto puede requerir 0,1, 1,0, 3,0, 6,0 o 10,0 mg/kg. Para una IgG que tiene una masa molecular de 150 000 g/mol (dos sitios de unión), estas dosis corresponden a aproximadamente 18 nM, 180 nM, 540 nM, 1,08 µM y 1,8 µM de sitios de unión para un volumen de sangre de 5 L.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o su porción de unión al antígeno se administra al mamífero mediante infusión intravenosa, es decir, la introducción del anticuerpo o su porción de unión al antígeno en la vena de un mamífero durante un cierto período de tiempo. En ciertas modalidades, el período de tiempo es de aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas o aproximadamente 8 horas.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o su porción de unión al antígeno se administra al mamífero mediante el suministro subcutáneo, es decir, debajo de la piel del mamífero, generalmente tras pellizcar y levantar la piel del tejido subyacente e inyectar el anticuerpo o su porción de unión al antígeno en el espacio debajo de la piel así formado.

En ciertas modalidades, se administra una dosis de un compuesto o una composición a un sujeto todos los días, en días alternos, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana o una vez cada dos semanas. En otras modalidades, se administran dos, tres o cuatro dosis de un compuesto o una composición a un sujeto todos los días, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana o una vez cada dos semanas. En algunas modalidades, se administra una(varias) dosis de un compuesto o una composición durante 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días o 21 días. En ciertas modalidades, se administra una dosis de un compuesto o una composición durante 1 mes, 1,5 meses, 2 meses, 2,5 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más. En algunas modalidades, el compuesto o la composición puede administrarse antes de, simultáneamente con o posteriormente a la exposición a una toxina.

Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, intradérmica, intravítrea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, transmucosa, rectal, por inhalación o tópicamente, particularmente a los oídos, la nariz, los ojos o la piel. El modo de administración se deja a discreción del médico. En la mayoría de los casos, la administración dará como resultado la liberación de un compuesto al torrente sanguíneo.

En modalidades específicas, puede ser deseable administrar un compuesto localmente. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, aplicación tópica, mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante, dicho implante es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, lo que incluye membranas, como membranas sialásticas o fibras. En tales casos, la administración puede dirigirse selectivamente a un tejido local sin una liberación sustancial de un compuesto al torrente sanguíneo.

La administración pulmonar puede emplearse además, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización, o a través de perfusión en un fluorocarbono o tensioactivo pulmonar sintético. En ciertas modalidades, se formula un compuesto como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales como los triglicéridos.

En otra modalidad, se suministra un compuesto en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat y otros, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial Infection, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); López Berestein, ibid., págs. 317-327; véase en general ibid.).

En otra modalidad, se suministra un compuesto en un sistema de liberación controlada (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Pueden usarse los ejemplos de sistemas de liberación controlada analizados en la revisión de Langer, 1990, Science 249: 1527-1533. En una modalidad, puede usarse una bomba (véase Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald y otros, 1980, Surgery 88: 507; Saudek y otros, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; véase además Levy y otros, 1985, Science 228: 190; During y otros, 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard y otros, 1989, J. Neurosurg. 71: 105).

La toxicidad y la eficacia terapéutica pueden medirse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación para determinar, por ejemplo, la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis con eficacia terapéutica en el 50 % de la población). La relación de dosis, expresada como la relación entre LD50/ED50, se conoce como índice terapéutico. Se prefieren los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos que presentan índices terapéuticos elevados.

La formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos puede obtenerse a partir de datos de ensayos de cultivo celular y/o estudios en animales, y preferentemente se encuentra dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en dependencia de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores influyen en la dosificación y el tiempo necesarios para tratar eficazmente a un paciente, que incluye, pero no se limita al tipo de paciente a tratar, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del paciente y otros trastornos presentes. Además, el tratamiento de un paciente con una cantidad con eficacia terapéutica de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede incluir un tratamiento único o puede incluir una serie de tratamientos.

Los programas de administración descritos anteriormente se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben considerarse limitantes. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que todas las dosis están dentro del alcance de la invención.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Humanización de dominios variables

Se diseñaron regiones variables de cadena pesada y ligera adecuadas para la administración humana en base a un anticuerpo monoclonal de ratón seleccionado por su capacidad para unirse a FcRn y bloquear la unión del FcRn y la albúmina. El anticuerpo de ratón no bloquea sustancialmente la unión de FcRn e IgG Fc. Mediante el uso de un modelo del anticuerpo monoclonal basado en estructuras de anticuerpos existentes, se diseñaron marcos de región variable para el anticuerpo humano a partir de segmentos de regiones V humanas. Con el fin de minimizar la inmunogenicidad potencial, se diseñaron varias variantes con aminoácidos seleccionados en ciertas ubicaciones del marco diseñadas para eliminar los epítopos de células T humanas.

Se construyeron genes de la región V de cadena pesada y ligera a partir de oligonucleótidos solapantes ensamblados en genes de longitud completa mediante el uso de la reacción en cadena de la ligasa (LCR), seguido de amplificación y adición de sitios de restricción adecuados para la clonación.

Se construyeron tres variantes de cadenas pesadas con una región constante de IgG4 humana que contenía la mutación S241P. Las variantes se denominan V_H1, V_H3, y V_H4. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de las variantes de la cadena pesada están representadas por las SEQ ID NOS: 12, 14 y 16, respectivamente. Las secuencias de oligonucleótidos de los dominios variables de las variantes de cadena pesada están representadas por las SEQ ID NOS: 11, 13 y 15, respectivamente. La Figura 1 muestra una alineación de las tres variantes. Se construyeron cuatro variantes de cadena ligera y se expresaron como cadenas kappa humanas. Las variantes se denominan V_K1, V_K2, V_K3, y V_K4. Las secuencias de aminoácidos de las variantes de la cadena ligera están representadas por las SEQ ID NOS: 18, 20, 22 y 24, respectivamente. Las secuencias de oligonucleótidos de los dominios variables de las variantes de cadena ligera están representadas por las SEQ ID NOS: 17, 19, 21 y 23, respectivamente. La Figura 2 muestra una alineación de las cuatro variantes.

Los anticuerpos se expresaron como IgG completas tras clonar los genes de la región V en un vector de expresión de mamífero con un promotor/potenciador inmediato/temprano de citomegalovirus cadena arriba, una secuencia señal de inmunoglobulina y una región constante de inmunoglobulina. Los vectores se transfectaron en células HEK EBNA, se cuantificó la expresión y se purificaron los anticuerpos en columnas de proteína A.

Las 12 combinaciones de cadena ligera-pesada de las tres variantes de cadena pesada y cuatro de cadena ligera se expresaron mediante transfección transitoria en células HEK EBNA. Los anticuerpos se purificaron en columnas de proteína A sefarosa y se cuantificaron. Como se indicó anteriormente, FcRn reside principalmente en los endosomas ácidos tempranos donde captura la albúmina endocitada a un pH bajo. Para bloquear la unión de FcRn a la albúmina, es deseable además que los anticuerpos FcRn se unan a los FcRn expuestos al medio intercelular a pH fisiológico (por ejemplo, pH 7,4). Por tanto, la unión de los anticuerpos purificados a FcRn se evaluó en un ensayo ELISA competitivo a pH 6,0 y pH 7,4.

Para el ELISA, se recubrió previamente una placa de microtitulación de fondo plano Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos durante una noche a pH 7,4 con un anticuerpo contra FcRn específico para un epítopo de unión a IgG distinto de la región de unión a la albúmina. Al día siguiente, 1 µg/ml de FcRn humano recombinante (Sino Biological Inc., núm. de cat. CT009-H08H) diluido en PBS a pH 7,4 se añadió a los pocillos y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Una serie de dilución de cuatro veces de anticuerpos IgG4 de prueba o control de 30 µg/ml a 0,0018 µg/ml se mezcló previamente con una concentración constante de anticuerpo murino parental biotinilado, se añadió a las placas y se incubó durante 1 hora a 37 °C. La unión del mAb biotinilado se detectó con estreptavidina-HRP y sustrato TMB. Se leyó la absorbancia a 450 nm y se graficaron las curvas de unión. La unión de las 12 combinaciones se evaluó a pH 7,4 y pH 6,0 y se cuantificó por comparación con el anticuerpo parental, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 - Afinidad relativa

Variante	Título promedio (µg/ml)	IC_{50} relativa promedio (en relación con IgG4 parental quimérico)	
		pH 7,4	pH 6
parental quimérico	10,30	1	1
V_H1/V_K1	27,92	0,51	0,64
V_H1/V_K2	25,61	0,29	0,45
V_H1/V_K3	27,93	0,37	0,56
V_H1/V_K4	28,00	0,45	0,75
V_H3/V_K1	33,05	1,39	1,09
V_H3/V_K2	24,27	1,24	0,90
V_H3/V_K3	24,76	0,50	0,52
V_H3/V_K4	21,56	0,58	0,61
V_H4/V_K1	37,18	1,06	1,06
V_H4/V_K2	38,71	1,06	1,06
V_H4/V_K3	33,95	1,24	0,86
V_H4/V_K4	34,95	1,37	0,99

Ejemplo 2

Maduración de la afinidad

Para mejorar la afinidad de unión a pH ácido y fisiológico, las regiones CDR3 de dominio variable de cadena pesada y ligera se mutaron y se seleccionaron en forma scFv a pH 6,0 y pH 7,4. Para preparar scFv, los genes que codifican V_H y V_K se ensamblaron con un enlazador de 15 aminoácidos $(G_4S)_3$ mediante el uso de PCR de superposición. La secuencia de scFv se clonó en un vector fagémido como una proteína de fusión del gen 3 y el vector se transformó en E. coli (TG1). El proceso de maduración de la afinidad se realizó mediante el uso de las variantes V_H1 y V_K1. Para la selección, se combinó una biblioteca de CDR3 de cadena pesada en V_H1 con la cadena ligera V_K1 parental humanizada y se combinó una biblioteca de CDR3 de cadena ligera en V_K1 con la cadena pesada V_H1 parental humanizada.

La variación de la secuencia de aminoácidos se introdujo en la región CDR3H de la cadena pesada en las posiciones de aminoácidos 94-100 (a.a. 95-100 de CDR3H y a.a. 94 de FW3) mediante el uso de un oligonucleótido que comprende la secuencia ARGBNSVVSBNCVNCNVCRSC (SEQ ID NO: 41) que proporcionó aminoácidos seleccionados en cada posición de la siguiente manera: a.a. 94: K, R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, L, P, Q, R, S, V, W, Y; a.a. 96: A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T; a.a. 97: A, C, D, F, G, H, L, P, R, S, T, V, Y; a.a. 98: A, D, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V; a.a. 99: A, C, D, G, H, N, P, R, S, T, Y; a.a. 100: A, G, S, T. La variación de la secuencia de aminoácidos se introdujo en la región CDR3H de la cadena pesada en las posiciones de los aminoácidos 94-99 (a.a. 95-99 de CDR3H y a.a. 94 de FW3) mediante el uso de un oligonucleótido que comprende la secuencia AGGNNSNNSNNSNNSRSC (SEQ ID NO: 42) que proporcionó aminoácidos seleccionados en cada posición de la siguiente manera: a.a. 94: R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 96: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 97: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 98: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 99: A, G, S, T.

Para cada CDR, una biblioteca de aproximadamente 5-10 x 10^7 que contiene fagos en el orden de 3-6 x 10^6 secuencias de ADN (es decir, se representaron aproximadamente 10-20 copias de cada secuencia de ADN) se seleccionó para la unión a antígeno soluble. Específicamente, las bibliotecas de fagos se mezclaron con FcRn biotinilado soluble, seguido de la captura de complejos de fagos FcRn-anticuerpo en perlas recubiertas con estreptavidina. Para obtener anticuerpos que se unen a FcRn en endosomas ácidos, así como también a pH fisiológico, se realizaron rondas sucesivas de selección de bibliotecas a pH alterno. Además, para aumentar el rigor de cada ronda de selección sucesiva, se redujo la concentración de antígeno FcRn. La ronda de selección inicial se realizó con una concentración de FcRn de 25 nM a pH 6,0. La segunda ronda se realizó a 2,5 nM a pH 7,4. La

tercera ronda se realizó a 0,25 nM a pH 6,0. Durante la tercera ronda, se realizó una selección de la "velocidad de disociación" a 0,25 nM a pH 6,0. La cuarta ronda se realizó a 0,1 nM a pH 7,4.

Los anticuerpos scFv se prepararon a partir de extractos periplásmicos bacterianos y se evaluaron mediante ELISA competitivo a pH 6,0 y pH 7,4. De más de 4100 extractos periplásmicos analizados a pH 6,0, se seleccionaron 99 para análisis adicionales a pH 7,4. En el ELISA competitivo, los fragmentos de anticuerpo scFv competían contra el anticuerpo murino parental biotinilado, que previamente se demostró que bloquea la interacción FcRn-albúmina, para unirse a FcRn inmovilizado. Como en el ELISA usado para evaluar variantes humanizadas, una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos se recubrió previamente con 1 µg/ml de un anticuerpo contra FcRn específico para un epítopo de unión a IgG distinto de la región de unión a la albúmina. La unión se determinó a pH 7,4 y pH 6,0. La Figura 3 muestra una comparación de ELISA competitivo a pH 6,0 y pH 7,4 en relación con el scFv parental (es decir, que consiste en V_H1/V_K1).

Se midieron mejoras sustanciales en la unión para scFv que contenían CDR3 de cadena pesada con maduración de la afinidad en el marco V_H1. Por lo tanto, estas cadenas pesadas se llevaron adelante para evaluarlas en combinación con cadenas ligeras mejoradas. No se identificaron variantes mejoradas para scFv que contenían CDR3 de cadena ligera con maduración de la afinidad en el marco V_K3.

Ejemplo 3

Desarrollo de anticuerpos IgG

Veintiuna cadenas pesadas con maduración de la afinidad (G03_B2, G15_C10, G15_C3, G15_B7, G02_F4, G24_C11, G19_F8, G47_B10, G47_H11, G47_H6, G48_G10, G48_E3, G49_F11, G50_B10, G50_G5, G50_C10, G54_D11, G52_G9, G51_H6, G49_H9.3, o G49_H9.5) se seleccionaron y expresaron con una cadena ligera humanizada (V_K3). Las veintiuna combinaciones se expresaron como anticuerpos IgG4 bivalentes que contenían la mutación S241P mediante transfección transitoria de células HEK, seguida de purificación de los anticuerpos IgG4.

Ejemplo 4

Características de unión al antígeno de los anticuerpos IgG4 determinadas por ELISA

Los anticuerpos IgG4 se evaluaron para determinar la unión de antígenos en un ELISA competitivo a pH 6,0 y pH 7,4. Una placa de microtitulación de fondo plano Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos (Fisher, núm. de cat. DIS-971-030J) se recubrió previamente con 1 µg/ml de un anticuerpo contra FcRn específico para un epítopo de unión a IgG distinto de la región de unión a la albúmina durante una noche a pH 7,4. Al día siguiente, se añadió a los pocillos 1 µg/ml de FcRn humano recombinante (Sino Biological Inc., núm. de cat. CT009-H08H) diluido en PBS a pH 7,4 y se incubó durante 1 hora a 37 ºC. Después de lavar las placas 3 veces con PBST a pH 7,4, las placas se bloquearon con PBSM a pH 7,4 durante 1 hora a 37 ºC. A partir de este punto, todas las etapas de lavado e incubación se realizaron al pH de ensayo elegido (pH 6,0 o 7,4). Después de lavar 3 veces con PBST, una serie de cuatro diluciones de anticuerpos evaluados de 25 µg/ml a 0,006 µg/ml de concentración final se mezcló previamente con una concentración constante de anticuerpo murino parental biotinilado (concentración final, 0,4 µg/ml), se añadió a las placas recubiertas con FcRn y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Después de 3 lavados con PBST, se detectó la unión del mAb biotinilado con estreptavidina-HRP (Sigma, núm. de cat. S5512) y sustrato TMB (Invitrogen, núm. de cat. 00-2023). La reacción se detuvo con HCl 3 M, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Dynex Technologies MRX TC II y se graficaron las curvas de unión. Un ejemplo de datos para cuatro de los anticuerpos ($G02_F4V_H1_V_K3$, $G24_C11V_H1_V_K3$, $G19_F8V_H1_V_K3$, $G47_B10V_H1_V_K3$) se muestra a pH 7,4 en la Figura4 (a) y a pH 6,0 en la Figura 4 (b). Los resultados completos obtenidos se resumen en la Tabla 3, que muestra los valores de IC_{50} relativa promedio para los experimentos realizados a pH 7,4 y pH 6,0 y el número (n) de experimentos. Los valores de IC_{50} de las combinaciones se normalizaron con el anticuerpo parental humanizado evaluado en la misma placa.

Tabla 3 - Afinidad relativa		
Variante	IC_{50} relativa promedio (en relación con el parental humanizado)	
	pH 7,4	pH 6
V_H1/V_K1	1	1
G03_B2/V_K3	4,3	9,1
G15_C10/V_K3	0,6	0,7
G15_C3/V_K3	0,8	0,9
G15_B7/V_K3	2,0	8,2
G02_F4/V_K3	0,8	0,6
G24_C11/V_K3	2,6	1,5
G19_F8/V_K3	0,9	0,7
G47_B10/V_K3	0,6	0,6
G47_H11/V_K3	1,5	1,0
G47_H6/V_K3	0,7	0,8
G48_G10/V_K3	2,4	1,0
G48_E3/V_K3	3,6	2,3
G49_F11/V_K3	1,5	1,0
G50_B10/V_K3	1,1	1,0
G50_G5/V_K3	1,2	0,9
G50_C10/V_K3	0,7	0,9
G54_D11/V_K3	0,8	0,6
G52_G9/V_K3	0,8	0,8
G51_H6/V_K3	2,9	2,3
G49_H9.3/V_K3	0,7	0,8
G49_H9.5/V_K3	1,0	0,8

Se identificaron catorce combinaciones con una actividad igual o mejor que la del parental humanizado a pH 6,0 o pH 7,4 y se llevaron adelante para la transfección estable en células de mieloma de ratón NS0.

Ejemplo 5

Expresión estable y purificación de anticuerpos

ADN del vector pAnt que codifica las 14 combinaciones de IgG (G15_C10/V_K3, G15_C3/ V_K3, G02_F4/ V_K3, G19_F8/ V_K3, G47_B10/V_K3, G47_H6/ V_K3, G49_F11/V_K3, G50_B10/ V_K3, G50_G5/ V_K3, G50_C10/V_K3, G54_D11/V_K3, G52_G9/ V_K3, G49_H9.3/ V_K3, or G49_H9.5/ V_K3) con actividad igual o mejor que el parental humanizado (es decir, que consiste en V_H1/V_K1) se transfectaron de manera estable en células de mieloma de ratón NS0 a través de electroporación. Adicionalmente, se incluyó el anticuerpo humanizado preferido, V_H1/V_K3. Las transfecciones estables se seleccionaron inicialmente mediante el uso de metotrexato 200 nM que se aumentó a 500 nM durante la expansión. Se evaluaron las colonias resistentes al metotrexato para cada construcción para determinar los niveles de expresión de IgG mediante el uso de un ELISA de IgG4, y se seleccionaron, expandieron y congelaron las mejores líneas de expresión en nitrógeno líquido. Se logró una transfección satisfactoria y una selección de clones estable para las 14 variantes humanizadas, así como también para V_H1/V_K3.

Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares en columnas de proteína A sefarosa, se renovó el tampón a PBS a pH 7,2 y se cuantificaron mediante $DO_{280\ nm}$ mediante el uso de un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos prevista.

La unión de anticuerpos humanizados con maduración de la afinidad a FcRn se evaluó a pH 7,4 y pH 6,0 mediante ELISA competitivo como se describió anteriormente y se comparó con el parental quimérico. Se usaron IgG con maduración de la afinidad humanizadas producidas por NS0 en todos los ensayos distintos de G50_C10/V_K3), que se purificó a partir de células HEK de expresión transitoria. Los datos ilustrativos a pH 6,0 se muestran en la Figura 5, y los datos ilustrativos a pH 7,4 se muestran en la Figura 6. Los datos se resumen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4 - Afinidad relativa		
Variante	IC_{50} relativa promedio (en relación con el parental humanizado)	
	pH 7,4	pH 6
V_H1/V_K3	1	1
G15_C10/V_K3	0,98	0,78
G15_C3/V_K3	0,80	0,68
G02_F4/V_K3	1,10	0,95
G19_F8/V_K3	1,19	0,76
G47_B10/V_K3	0,74	0,58
G47_H6/V_K3	0,89	0,84
G49_F11/V_K3	1,35	0,98
G50_B10/V_K3	1,29	1,23
G50_G5/V_K3	1,63	0,84
G50_C10/V_K3	0,54	0,89
G54_D11/V_K3	1,93	0,62
G52_G9/V_K3	0,92	0,56
G49_H9.3/V_K3	0,73	0,58
G49_H9.5/V_K3	0,87	0,80

Ocho de las variantes (G15_C3/ V_K3, G47_B10/V_K3, G47_H6/ V_K3, G50_C10/ V_K3, G54_D11/V_K3, G52_G9/ V_K3, G49_H9.3/ V_K3, y G49_H9.5/ V_K3) se mejoraron tanto a pH 6,0 y pH 7,4 en comparación con la variante humanizada preferida. Se mejoró un anticuerpo a pH 6,0 pero no a pH 7,4. Estos ocho anticuerpos se llevaron adelante para el análisis de Biacore.

Ejemplo 6

Determinación de la cinética de unión de mAb mediante resonancia de plasmón superficial

La cinética de unión de las variantes seleccionadas se comparó con el parental murino y el parental humanizado (V_H1/V_K1) por BIACORE® mediante el uso de un instrumento T200. Los anticuerpos se inmovilizaron en la superficie de un chip sensor CM5 de la Serie S mediante el uso de química de acoplamiento de amina estándar y el analito (FcRn) fluyó sobre la superficie. Se seleccionó un intervalo de dilución doble de 50-0,01 nM de FcRn. La fase de asociación del analito FcRn se controló durante 450 segundos, y la disociación se midió inicialmente durante 250 o 2500 segundos, a 40 µl/min. F_c1 fue un canal de referencia y se restó de otras celdas de flujo para corregir la unión no específica. La diferencia de veces en la K_D se calculó tras dividir la K_D del parental humanizado por la del anticuerpo de prueba en el mismo chip. Los valores cinéticos se basan en un modelo de unión 1:1 (Tabla 5).

Los anticuerpos humanizados con maduración de la afinidad G15_C3/ V_K3, G47_B10/ V_K3, and G50_C10/V_K3 mostraron mejoras significativas en la afinidad en comparación con el parental humanizado (que varía entre -7,1 a -50 veces en promedio). La velocidad de disociación baja observada para G50_C10/V_K3 se acercaba a los límites de detección del instrumento Biacore. Las tres mejores variantes se evaluaron de nuevo para proporcionar una comparación de clasificación directa con el tiempo de disociación aumentado a 4500 segundos con el fin de determinar con mayor precisión la constante de disociación para G50_C10/V_K3.

Tabla 5 - Cinética de unión de mAb anti-FcRn humanos						
mAb	Fc	K_a (1/Ms)	K_d (1/*s*)	K_D (nM)	χ^2	Diferencia de veces en la K_D
Parental murino	2	4,75E+05	1,29E-03	2,7	0,02	0,9
V_H1/V_K1	3	4,77E+05	1,16E-03	2,43	0,08	1,0
G47_B10/V_K3	4	4,15E+05	1,34E-04	0,33	0,07	7,4
V_H1/V_K1	2	5,37E+05	1,10E-03	2,05	0,02	1,0
G15_C3/ V_K3	3	6,68E+05	1,96E-04	0,29	0,06	7,1
G50_C10/ V_K3 (HEK)	4	3,99E+05	1,00E-05	0,025	0,07	82
V_H1/V_K1	2	5,17E+05	1,02E-03	1,97	0,08	1,0
G52_G9/ V_K3	3	4,55E+05	9,04E-04	1,99	0,06	1,0
G49_H9.3/ V_K3	4	5,47E+05	6,08E-04	1,11	0,09	1,8
V_H1/V_K1	2	4,47E+05	1,17E-03	2,61	0,08	1,0
G47_H6/ V_K3	3	3,89E+05	8,14E-04	2,09	0,05	1,2
G49_H9.5/ V_K3	4	1,5E+05	1,81E-04	1,21	0,07	2,2
V_H1/V_K1	2	4,72E+05	1,10E-03	2,34	0,04	1,0
G54_D11/V_K3	3	5,67E+05	2,10E-03	3,71	0,03	0,6
G50_C10/ V_K3	4	2,98E+05	2,34E-05	0,078	0,09	30
G15_C3/ V_K3	2	3,20E+05	1,25E-04	0,39	0,06	-
G47_B10/V_K3	3	3,74E+05	9,12E-04	0,24	0,1	-
G50_C10/ V_K3	4	2,83E+05	1,54E-05	0,054	0,12	-

En un estudio adicional, la resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizó mediante el uso de un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare) con chips sensores CM5 acoplados con mAb (~ 500-700 unidades de resonancia) mediante el uso de la química de acoplamiento de amina como describe el fabricante. El acoplamiento se realizó tras inyectar 2 µg/ml de cada proteína en acetato de sodio 10 mM, a pH 4,5 (GE Healthcare), mediante el uso del kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare). Se usó tampón HBS-P a pH 7,4 (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 0,005 %) o tampón fosfato a pH 6,0 (tampón fosfato 67 mM, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,005 %) como tampón de corrida y tampón de dilución. La cinética de unión se determinó tras inyectar cantidades valoradas de hFcRn con etiqueta de histidina monomérico (400,0-12,5 nM) sobre Ab inmovilizados a pH 7,4 o pH 6,0. Todos los experimentos de SPR se realizaron a 25 °C con una velocidad de flujo de 40 µl/min. Los datos de unión se ajustaron a cero y se restó el valor de la celda de referencia. Se usó el modelo de unión de ligando de Langmuir 1:1 proporcionado por el programa BIAevaluation (versión 4.1) para determinar la cinética de unión. La cercanía del ajuste se describe mediante el valor estadístico χ^2.

La Figura 7 muestra gráficos de asociación y disociación de unión para (A) SYNT002h (parental humanizado V_H1/V_K1), (B) SYNT002-3 (G15_C3/ V_K3), (C) SYNT002-8 (G47_B10/ V_K3), (D) SYNT002-16 (G50_C10/V_K3), (E) SYNT002-17 (G54_D11/V_K3) y (F) SYNT002-21 (G49_H9.3/ V_K3), determinado por resonancia de plasmón superficial. Las constantes de velocidad cinética se proporcionan en la Tabla 6, a continuación. Las constantes de velocidad cinética se obtuvieron mediante el uso de un modelo de interacción bimolecular simple de primer orden (1:1) de Langmuir. Los valores cinéticos representan el promedio de duplicados. Los valores de χ^2 (chi-cuadrado) representan el ajuste al modelo de unión usado.

Tabla 6 - Cinética de unión de mAb anti-FcRn humanos				
mAb	K_a (1/*Ms*)	K_d (1/*s*)	K_D (nM)	χ^2
pH 7,4				
V_H1/V_K1	1,7 ± 0,1E+05	5,1 ± 0,1E-03	30,0	5,0
G15_C3/ V_K3	0,9 ± 0,2E+05	0,7 ± 0,0E-03	7,8	4,0
G47_B10/V_K3	1,5 ± 0,1E+05	0,6 ± 0,0E-03	4,0	0,9
G50_C10/ V_K3	1,2 ± 0,1E+05	0,00008 ± 0,0E-03	0,00066	0,6
G54_D11/V_K3	2,2 ± 0,1E+05	7,5 ± 0,0E-03	34,0	5,0
G49_H9.3/ V_K3	1,8 ± 0,1E+05	1,8 ± 0,1E-03	10,0	3,9
pH 6,0				
V_H1/V_K1	4,5 ± 0,5E+05	1,3 ± 0,1E-03	2,8	11,7
G15_C3/ V_K3	2,7 ± 0,1E+05	0,2 ± 0,0E-03	0,7	27,0
G47_B10/V_K3	3,5 ± 0,2E+05	0,2 ± 0,1E-03	0,6	5,5
G50_C10/ V_K3	1,1 ± 1,0E+05	0,047 ± 0,2E-03	0,4	2,1
G54_D11/V_K3	5,9 ± 0,3E+05	0,8 ± 0,1E-03	1,6	36,0
G49_H9.3/ V_K3	5,3 ± 0,3E+05	0,9 ± 0,0E-03	1,7	20,0

Los resultados muestran que todos los anticuerpos se unen al FcRn humano con cinéticas distintas en ambas condiciones de pH. Las variantes con maduración de la afinidad se unieron al FcRn humano con una afinidad mejorada en ambas condiciones de pH en comparación con el parental humanizado, excepto para G54_D11/V_K3, que solo mejoró a pH 6,0.

Ejemplo 7

Estudio de aclaramiento de albúmina

Se realizó un estudio *in vivo* mediante el uso de ratones transgénicos para examinar los efectos de los anticuerpos anti-FcRn sobre el aclaramiento de albúmina. El día 0, todos los ratones se precargaron mediante inyección intravenosa con 500 mg/kg de albúmina humana. A cada grupo de ratones (n = 6) se le administró PBS o G47_B10/V_K3 (SYNT002-8) o G50_C10/V_K3 (SYNT002-16) a 20 mg/kg el día 1. Se recogieron muestras de sangre de cada ratón a las 24, 32, 48, 56, 72, 96, 120 y 144 horas después de la inyección intravenosa y se procesaron para obtener el plasma. Se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de albúmina mediante ELISA.

La Figura 8A muestra los resultados del estudio de SYNT002-8 (G47_B10/ VK3) y SYNT002-16 (G50_C10/VK3) graficados como el porcentaje medio de albúmina restante basado en los valores de referencia de 24 horas (± error estándar) en los momentos indicados.

La Figura 8B muestra los resultados de un segundo experimento que demuestra que SYNT002-8 (G47_B10/ V_K3) aumentó eficazmente el catabolismo de la albúmina de una manera dependiente de la dosis. Se administraron PBS, control de isotipo IgG4 (20 mg/kg) y tres concentraciones diferentes de SYNT002-8 (G47_B10/ V_K3) (5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg), y los resultados se presentan como el $\log_{10}$ del porcentaje medio (± SEM) de albúmina humana restante en los momentos indicados en comparación con los valores de referencia de 24 horas. Las curvas representan un análisis de regresión no lineal con intervalos de confianza de 90 %. Las pendientes de estas curvas ± SD se analizaron mediante ANOVA de una vía (n = 5-11; *P = 0,031; **P = 0,0069; ***P = 0,0003; ****P <0,0001).

Ejemplo 8

Estudio de protección contra el acetaminofeno (APAP)

Se realizó un estudio *in vivo* mediante el uso de ratones transgénicos para examinar los efectos protectores de los anticuerpos anti-FcRn contra la hepatotoxicidad del acetaminofeno (APAP). Para ello, se administró una dosis subletal de APAP (400 mg/kg) a ratones *Fcgrt*^{TG}. Se administró PBS, el antídoto clínico estándar *N*- acetilcisteína (NAC) (140 mg/kg), SYNT002-8 (G47_B10/ V_K3) (10 mg/kg) o control de isotipo IgG4 (10 mg/kg) durante dos horas después de la administración de APAP. Se midieron los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) seis y ocho horas después de la administración de APAP.

La Figura 9 muestra que SYNT002-8 (G47_B10/ V_K3) a una dosis de 10 mg/kg proporcionó protección a los ratones *Fcgrt*^{TG} equivalente a la proporcionada por la NAC administrada dos horas después de la exposición subletal a APAP en comparación con el tratamiento control (n = 3-5; *P <0,05; **P <0,0038; ***P <0,001). En consecuencia, en un entorno terapéutico, SYNT002-8 confiere protección contra la exposición tóxica a APAP en la misma medida que el antídoto estándar actual NAC.

Listado de Secuencias

<110> Syntimmune, Inc. Blumberg, Laurence J.
Blumberg, Richard S.
Jones, Susan Dana
Roopenian, Derry
Holgate, Robert
Jones, Timoth
Hearn, Arron

<120> Anticuerpos anti-FcRn humanizados con maduración de la afinidad

<130> 162255.46276

<150> U.S. 60/326,907
<151> 2016-04-25

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 15
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(15)

<400> 1

```
gac tat gga atg cac                                                    15
Asp Tyr Gly Met His
1               5
```

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

```
Asp Tyr Gly Met His
1               5
```

<210> 3
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 3

```
tac att agt agt ggc agt agt acc atc tac tat gca gac aca gtg aag        48
Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1               5                   10                  15

ggc 51
Gly
```

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

```
Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

<210> 5
<211> 33
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)

<400> 5

```
aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat gta gct                        33
Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
1               5                   10
```

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

```
Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
1               5                   10
```

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(21)

<400> 7

tat gca tcc aat cgc tac act 21
Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(24)

<400> 9

cag cag gat tat agc tct ctc acg 24
Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 11
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> misc_característica
<222> (91)..(105)
<223> CDR

<220>

<221> misc_característica
<222> (148)..(198)
<223> CDR

<220>
<221> misc_característica
<222> (295)..(324)
<223> CDR

<400> 11

```
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg          48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt nnn nnn          96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
            20                  25                  30

nnn nnn nnn tgg gtt cgt cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt         144
Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn         192
Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

nnn nnn cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tat         240
Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agt ctg agg gcc gag gac acg gcc atg tat tac tgt         288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca agg nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn tgg ggt caa gga         336
Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

acc tca gtc acc gtc tcc tca                                            357
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_característica
<222> (31)..(31)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 31 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (32)..(32)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 32 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (33)..(33)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 33 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (34)..(34)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 34 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (35)..(35)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 35 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (50)..(50)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 50 significa for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (51)..(51)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 51 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (52)..(52)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 52 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (53)..(53)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 53 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (54)..(54)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 54 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (55)..(55)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 55 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (56)..(56)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 56 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (57)..(57)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 57 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (58)..(58)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 58 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (59)..(59)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 59 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (60)..(60)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 60 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica

<222> (61)..(61)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 61 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (62)..(62)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 62 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (63)..(63)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 63 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (64)..(64)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 64 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (65)..(65)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 65 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (66)..(66)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 66 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (99)..(99)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 99 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (100)..(100)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 100 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (101)..(101)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 101 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (102)..(102)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 102 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (103)..(103)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 103 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (104)..(104)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 104 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (105)..(105)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 105 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (106)..(106)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 106 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (107)..(107)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 107 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (108)..(108)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 108 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 12

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
            20                  25                  30

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

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 13
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> misc_característica
<222> (91)..(105)
<223> CDR; la "n" en las posiciones 91 a 105 significa a, g, c o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (148)..(198)

<223> CDR; la "n" en las posiciones 148 a 198 significa a, g, c o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (295)..(324)
<223> CDR; la "n" en las posiciones 295 a 324 significa a, g, c o t

<400> 13

```
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg          48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt nnn nnn          96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
            20                  25                  30

nnn nnn nnn tgg gtt cgt cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt         144
Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn         192
Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

nnn nnn cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tat         240
Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agt ctg agg gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt         288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca agg nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn tgg ggt caa gga         336
Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

acc acg gtc acc gtc tcc tca                                            357
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_característica
<222> (31)..(31)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 31 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (32)..(32)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 32 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (33)..(33)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 33 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (34)..(34)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 34 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (35)..(35)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 35 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (50)..(50)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 50 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (51)..(51)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 51 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (52)..(52)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 52 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (53)..(53)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 53 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (54)..(54)

<223>

El 'Xaa' en la ubicación 54 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (55)..(55)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 55 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (56)..(56)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 56 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (57)..(57)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 57 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (58)..(58)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 58 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (59)..(59)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 59 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (60)..(60)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 60 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (61)..(61)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 61 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (62)..(62)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 62 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (63)..(63)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 63 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (64)..(64)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 64 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (65)..(65)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 65 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (66)..(66)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 66 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (99)..(99)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 99 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (100)..(100)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 100 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (101)..(101)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 101 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (102)..(102)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 102 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (103)..(103)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 103 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (104)..(104)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 104 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (105)..(105)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 105 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (106)..(106)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 106 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (107)..(107)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 107 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (108)..(108)

<223> El 'Xaa' en la ubicación 108 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 14

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
            20                  25                  30

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

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 15
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> misc_característica
<222> (91)..(105)
<223> CDR; la "n" en las posiciones 91 a 105 significa a, g, c, o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (148)..(198)
<223> CDR; la "n" en las posiciones 148 a 198 significa a, g, c, o t

<220>

<221> misc_característica
<222> (295)..(324)
<223> CDR; la "n" en las posiciones 295 a 324 significa a, g, c, o t

<400> 15

```
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg          48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt nnn nnn          96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
            20                  25                  30

nnn nnn nnn tgg gtt cgt cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt         144
Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn         192
Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

nnn nnn cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tat         240
Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt         288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca agg nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn tgg ggt caa gga         336
Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

acc acg gtc acc gtc tcc tca                                            357
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_característica
<222> (31)..(31)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 31 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (32)..(32)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 32 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (33)..(33)

<223>

El 'Xaa' en la ubicación 33 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (34)..(34)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 34 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (35)..(35)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 35 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (50)..(50)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 50 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (51)..(51)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 51 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (52)..(52)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 52 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (53)..(53)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 53 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (54)..(54)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 54 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (55)..(55)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 55 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (56)..(56)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 56 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (57)..(57)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 57 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (58)..(58)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 58 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (59)..(59)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 59 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (60)..(60)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 60 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (61)..(61)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 61 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (62)..(62)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 62 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (63)..(63)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 63 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (64)..(64)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 64 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (65)..(65)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 65 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (66)..(66)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 66 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (99)..(99)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 99 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (100)..(100)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 100 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (101)..(101)

<223>

El 'Xaa' en la ubicación 101 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (102)..(102)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 102 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (103)..(103)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 103 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (104)..(104)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 104 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (105)..(105)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 105 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (106)..(106)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 106 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (107)..(107)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 107 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<221> misc_característica
<222> (108)..(108)
<223>

El 'Xaa' en la ubicación 108 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, o Phe.

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
            20                  25                  30

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

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 17
<211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 17

```
agt att gtg atg acc cag tct ccc gac ttc ctg ctt gca tca gtg gga   48
Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Leu Leu Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat   96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
            20                  25                  30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata  144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc  192
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct  240
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65                  70                  75                  80

gaa gac gtg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg  288
Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
                85                  90                  95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa                         318
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 19

```
agt att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga   48
Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat   96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
            20                  25                  30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata  144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc  192
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct  240
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65                  70                  75                  80

gaa gac gtg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg  288
Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
                85                  90                  95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa                         318
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 20
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 21

```
gac att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga   48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat   96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
            20                  25                  30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata  144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc agt ggc  192
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct  240
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65                  70                  75                  80

gaa gac gtg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg  288
Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
                85                  90                  95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa                         318
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 22
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Humanizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 23

```
gac att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga   48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat   96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
            20                  25                  30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata  144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc agt ggc  192
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct  240
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65                  70                  75                  80

gaa gac gtg gca gtt tat tac tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg  288
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
                85                  90                  95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa                         318
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 25

```
Gly Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 26
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 26

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 27

```
Ala Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 29

```
Phe Ser Ser Leu Ser Thr Val Gly Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Ser Ser Leu Ser Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

                    115
```

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 31

```
Leu Glu Ser Thr Thr Ala Val Gly Asp Tyr
1               5                  10
```

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 32

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Glu Ser Thr Thr Ala Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 33

```
Phe Asp Thr Pro Ala Thr Val Gly Asp Tyr
1               5                  10
```

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Thr Pro Ala Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 35

```
Phe Asp Thr Pro Ser Thr Val Gly Asp Tyr
1               5                  10
```

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Thr Pro Ser Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 37

```
Phe Asp Ser Leu Ser Thr Val Gly Asp Tyr
1               5                  10
```

<210> 38
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Ser Leu Ser Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 39

```
Leu Glu Ala Val Ser Ala Val Gly Asp Tyr
1               5                  10
```

<210> 40
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Maduración de la afinidad

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Glu Ala Val Ser Ala Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 41
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<220>
<221> misc_característica
<222> (5)..(5)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (11)..(11)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (14)..(14)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (16)..(16)
<223> n es a, c, g o t

<400> 41
argbnsvvsb ncvncnvcrs c 21

<210> 42
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<220>
<221> misc_característica
<222> (4)..(5)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (7)..(8)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (10)..(11)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_característica
<222> (13)..(14)
<223> n es a, c, g o t

<400> 42
aggnnsnnsn nsnnsrsc 18

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Consenso

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> El residuo es A o L

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> El residuo es T o R

<400> 43

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa
1 5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Consenso

<220>
<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)
<223> El residuo es A o L

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> El residuo es T o R

<400> 44

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa Val Gly Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Consenso

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> El residuo es G, A o L

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> El residuo es T o R

<400> 45

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa
1 5

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Consenso

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> El residuo es G, A o L

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> El residuo es T o R

<400> 46

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa Val Gly Asp Tyr
1 5 10

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Consenso

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> El residuo es G, A, F o L

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> El residuo es E, A o D

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> El residuo es S, T o A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> El residuo es T, L, P o V

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> El residuo es T, S o A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> El residuo es T o A

<400> 47

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Consenso

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> El residuo es G, A, F o L

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> El residuo es E, A o D

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)

<223> El residuo es S, T o A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> El residuo es T, L, P o V

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> El residuo es T, S o A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> El residuo es T o A

<400> 48

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Gly Asp Tyr
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a FcRn que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera,
en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 32; y en donde la secuencia de la región variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 22.

2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 28 y la secuencia de la región variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 22.

3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno quimérico o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado.

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene el isotipo IgG4, en donde opcionalmente el anticuerpo contiene modificaciones S241P en las cadenas pesadas y/o el anticuerpo carece de lisinas C-terminales en las cadenas pesadas.

5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un scFv, Fv, Fab', Fab, $F(ab')_2$ o diacuerpo.

6. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno contra FcRn de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Una célula huésped procariota o eucariota que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 6.

9. Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno contra FcRn de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la inhibición de la interacción entre FcRn y la albúmina, tras poner en contacto a FcRn con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la reducción de los niveles de

    (a) albúmina en un sujeto mediante la administración al sujeto de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno; o
    (b) toxinas unidas a albúmina en un sujeto mediante la administración al sujeto de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, opcionalmente en donde la toxina unida a la albúmina es cobre, hematina, ácido graso de cadena larga, zinc, bilirrubina, tiroxina, eicosanoides, triptófano, vitamina D3, ácidos biliares, calcio, magnesio, cloruro, indometacina, azul de bromofenol, salicilato, warfarina, fenilbutazona, digoxina, furosemida, fenitoína, clorpropamida, bencilpenicilina, azul de Evans, diazepam, ibuprofeno, naproxeno, clofibrato, clorpromazina, imipramina, quinidina, ricina, amiodarona o acetaminofeno, preferentemente en donde la toxina unida a la albúmina es acetaminofeno.

12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de una afección médica asociada con la toxicidad de la albúmina, en donde la afección médica es enfermedad vascular periférica y coronaria aterosclerótica, una complicación vasculopática diabética, enfermedad de Alzheimer, una lesión cerebral traumática, diabetes mellitus o insuficiencia renal en etapa terminal.

13. Un anticuerpo anti-FcRn o su fragmento para su uso en promover

    (a) la degradación de la albúmina endógena antes de la administración de un agente terapéutico a base de albúmina mediante la administración de un anticuerpo anti-FcRn o su fragmento a un sujeto que necesite tratamiento; o
    (b) la degradación de un agente terapéutico a base de albúmina exógena que se ha administrado a un sujeto mediante la administración al sujeto un anticuerpo anti-FcRn o su fragmento,

en donde el anticuerpo anti-FcRn o su fragmento comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22.

Figura 1

Kabat No.	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3	4 5 6 7 A B C D E F 8 9 0 1 2 3 4	5 6 7
SEQ ID NO:			
ADM31	S I V M T Q T P K F L L V S A G D R V T I T C	K A S Q S V S N D V A	W Y Q
VK1	S I V M T Q S P D F L L A S V G D R V T I T C	K A S Q S V S N D V A	W Y Q
VK2	S I V M T Q S P D S L S A S V G D R V T I T C	K A S Q S V S N D V A	W Y Q
VK3	D I V M T Q S P D S L S A S V G D R V T I T C	K A S Q S V S N D V A	W Y Q
VK4	D I V M T Q S P D S L S A S V G D R V T I T C	K A S Q S V S N D V A	W Y Q

Kabat No.	4 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	5 0 1 2 3 4 5 6	6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8	7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8	8 9 0
SEQ ID NO:					
ADM31	Q K P G Q S P K L L I Y	Y A S N R Y T	G V P D R F T G S G Y G T D F T F T I S T V Q A		
VK1	Q K P G Q P P K L L I Y	Y A S N R Y T	G V P D R F T G S G Y G T D F T L T I S S L Q A		
VK2	Q K P G Q P P K L L I Y	Y A S N R Y T	G V P D R F T G S G Y G T D F T L T I S S L Q A		
VK3	Q K P G Q P P K L L I Y	Y A S N R Y T	G V P D R F S G S G Y G T D F T L T I S S L Q A		
VK4	Q K P G Q P P K L L I Y	Y A S N R Y T	G V P D R F S G S G Y G T D F T L T I S S L Q A		

Kabat No.	9 0 1 2 3 4 5 6 7 8	1 0 1 2 3 4 5 A B C D E F 6 7	8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8
SEQ ID NO:			
ADM31	E D L A V Y F C	Q Q D Y S S L T	F G A G T K L E L K
VK1	E D V A V Y F C	Q Q D Y S S L T	F G Q G T K L E I K
VK2	E D V A V Y F C	Q Q D Y S S L T	F G Q G T K L E I K
VK3	E D V A V Y F C	Q Q D Y S S L T	F G Q G T K L E I K
VK4	E D V A V Y Y C	Q Q D Y S S L T	F G Q G T K L E I K

Figura 2

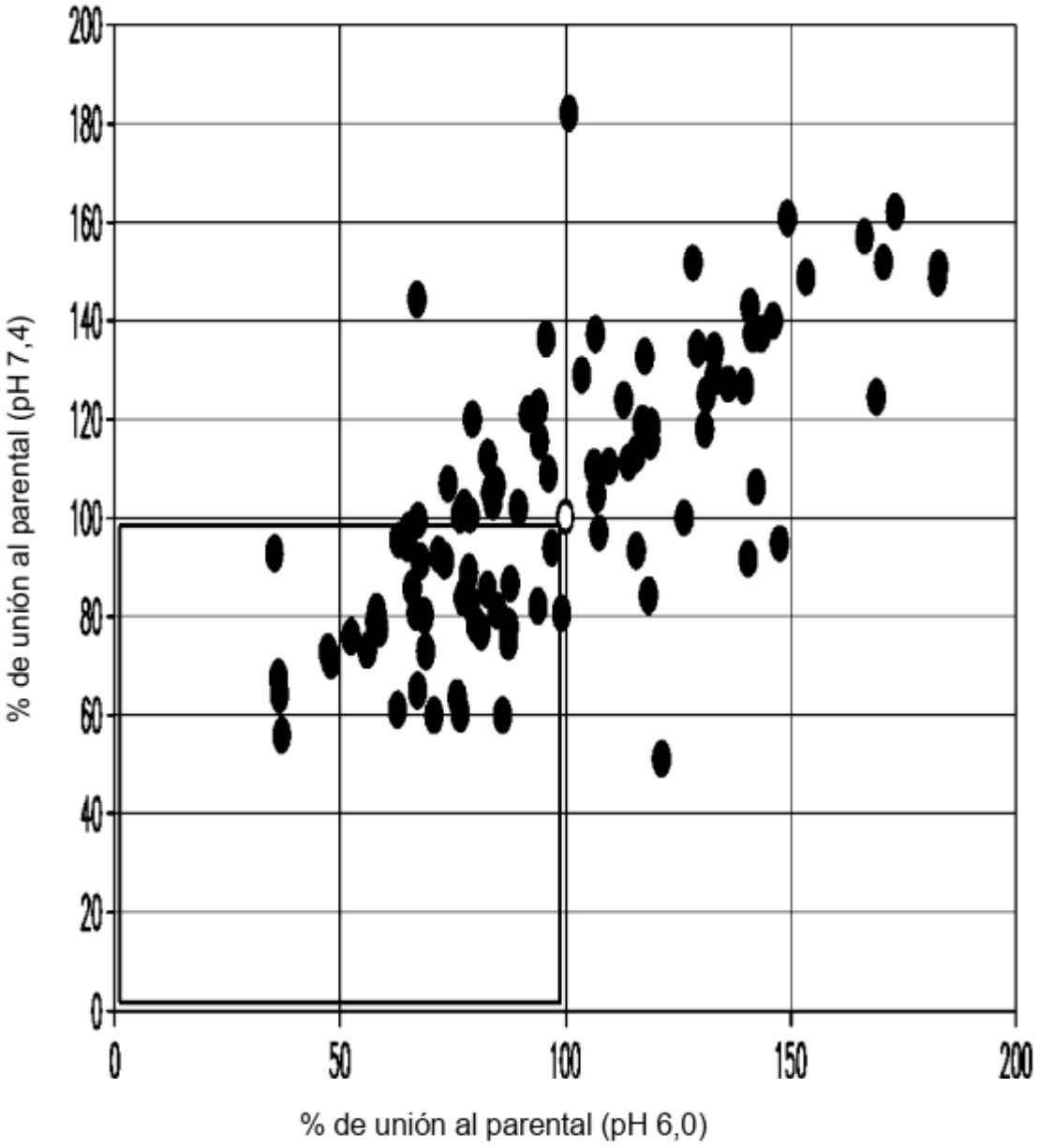
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
% de unión al parental (pH 7,4)
0
50
100
150
200
% de unión al parental (pH 6,0)

Figura 3

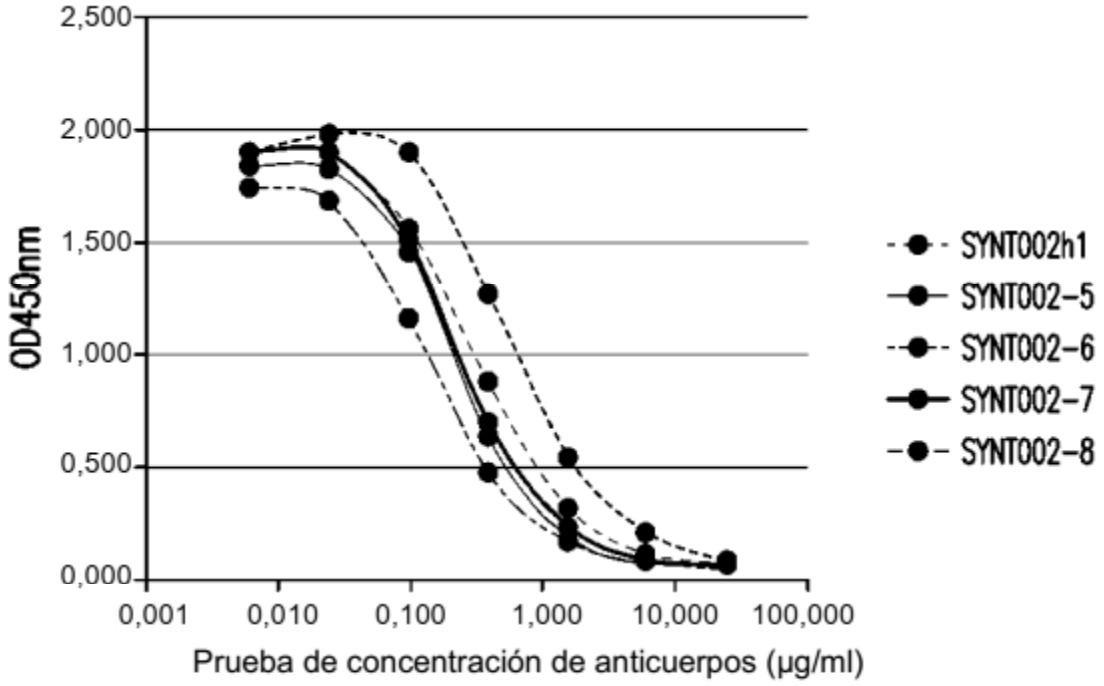

Figura 4A

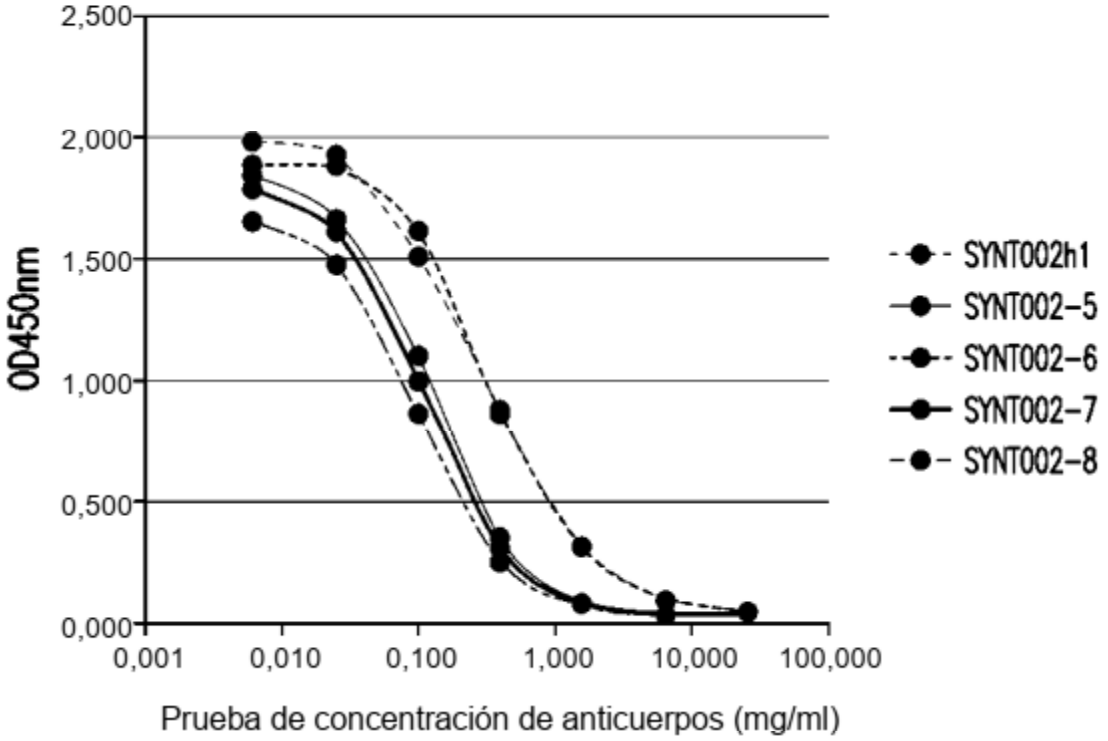

Figura 4B

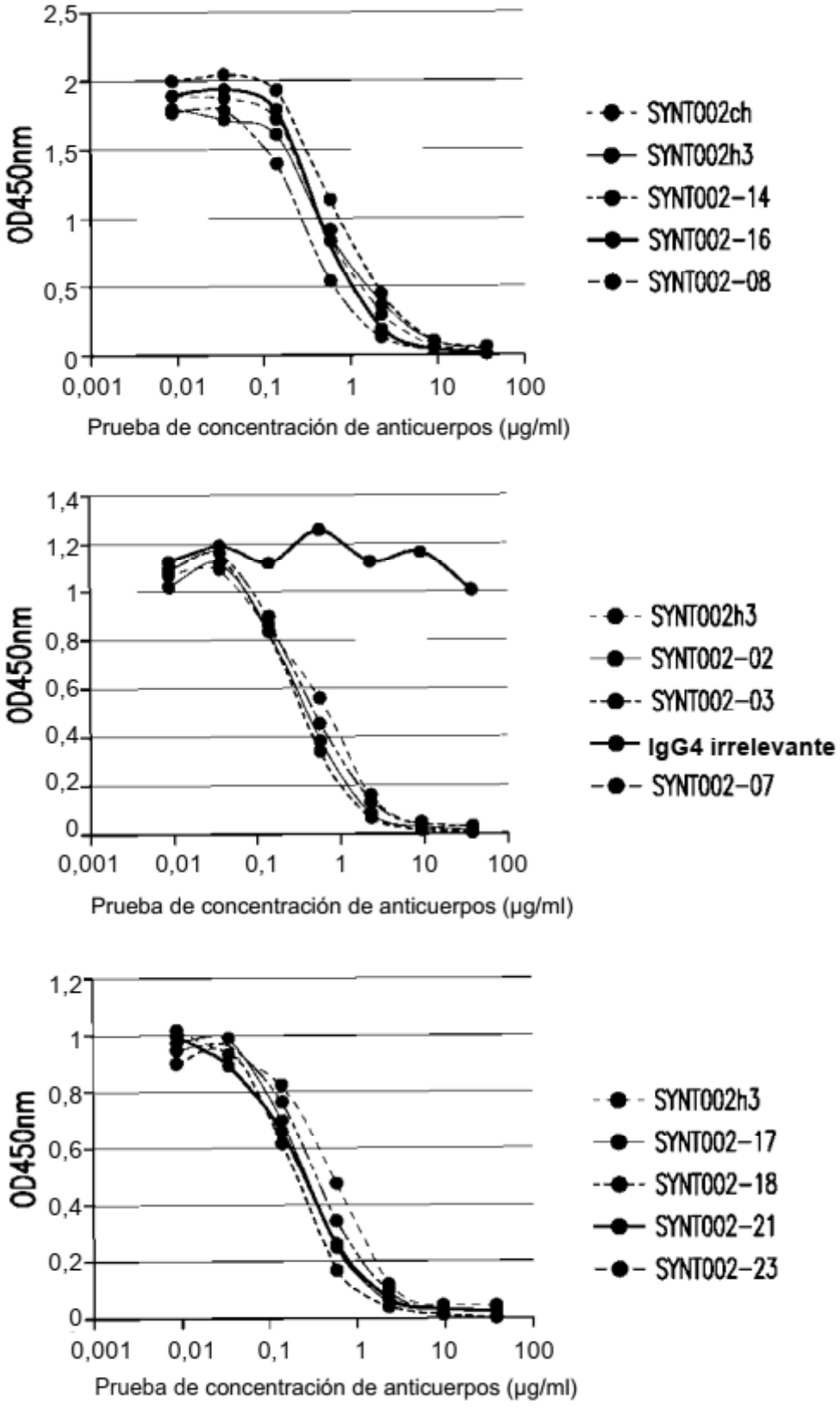
OD450nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Prueba de concentración de anticuerpos (µg/ml)
SYNT002ch
SYNT002h3
SYNT002-14
SYNT002-16
SYNT002-08
OD450nm
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Prueba de concentración de anticuerpos (µg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-02
SYNT002-03
IgG4 irrelevante
SYNT002-07
OD450nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Prueba de concentración de anticuerpos (µg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-17
SYNT002-18
SYNT002-21
SYNT002-23

Figura 5

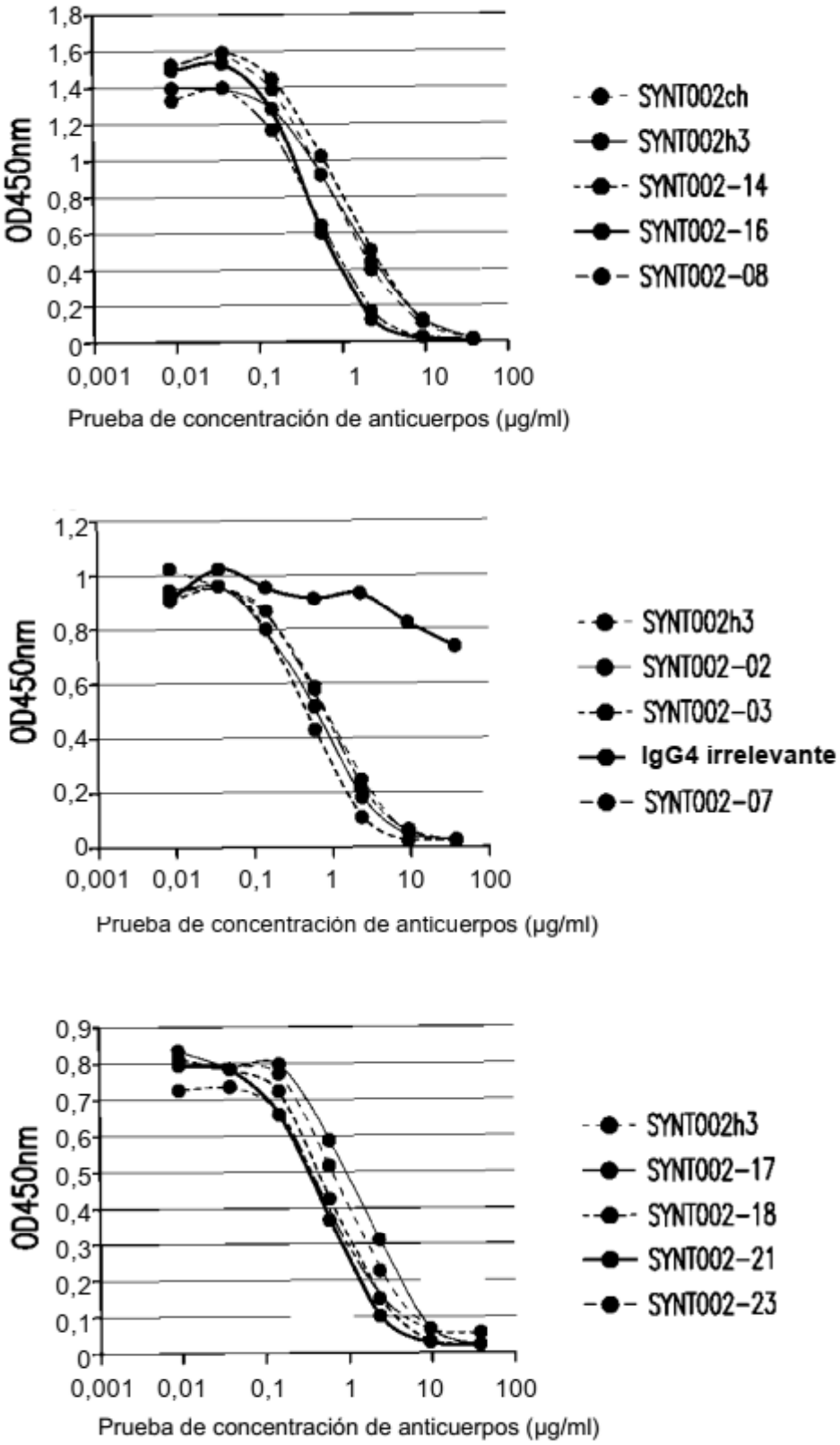
OD450nm
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Prueba de concentración de anticuerpos (µg/ml)
SYNT002ch
SYNT002h3
SYNT002-14
SYNT002-16
SYNT002-08
OD450nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Prueba de concentración de anticuerpos (µg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-02
SYNT002-03
IgG4 irrelevante
SYNT002-07
OD450nm
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Prueba de concentración de anticuerpos (µg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-17
SYNT002-18
SYNT002-21
SYNT002-23

Figura 6

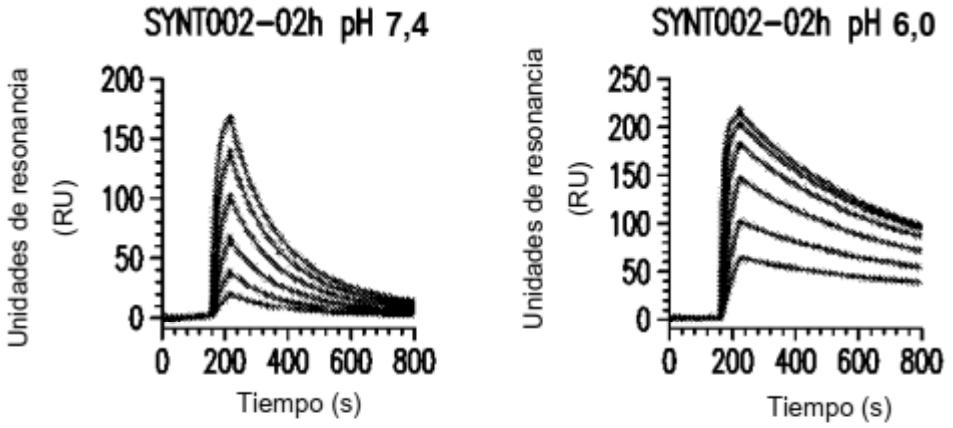

Figura 7A

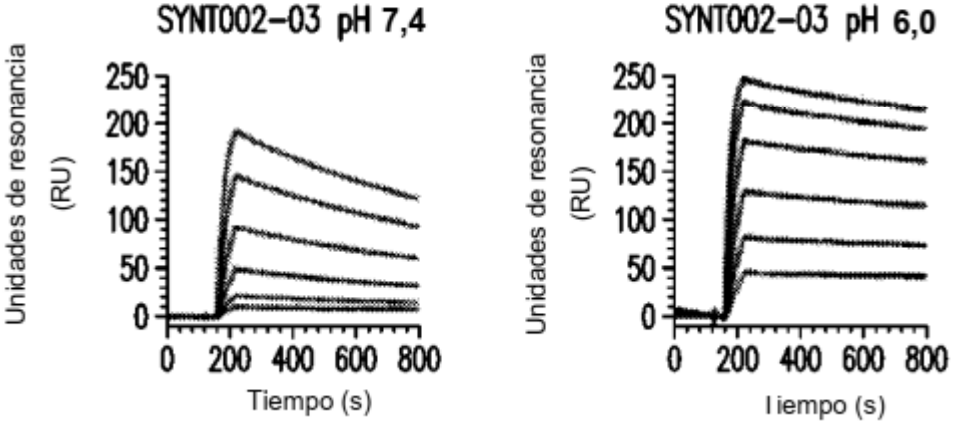

Figura 7B

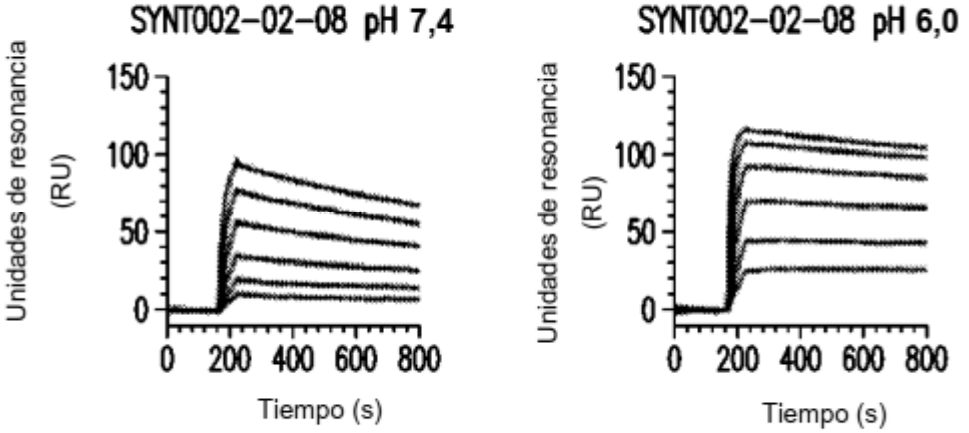

Figura 7C

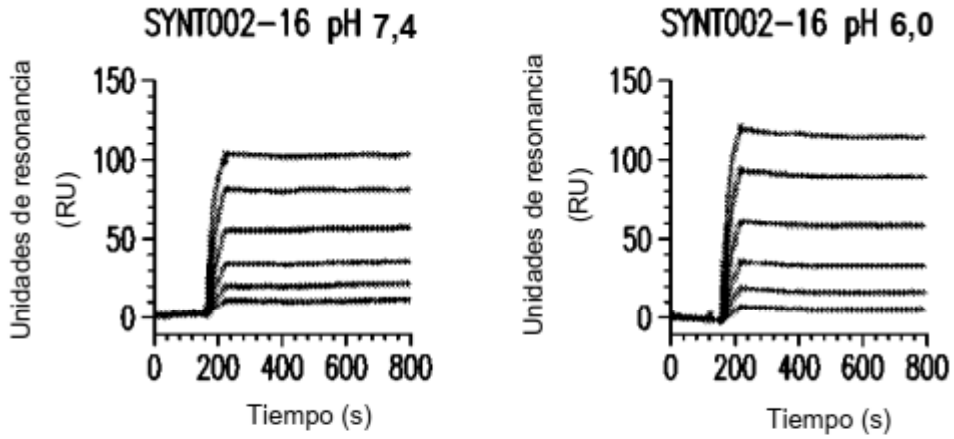

Figura 7D

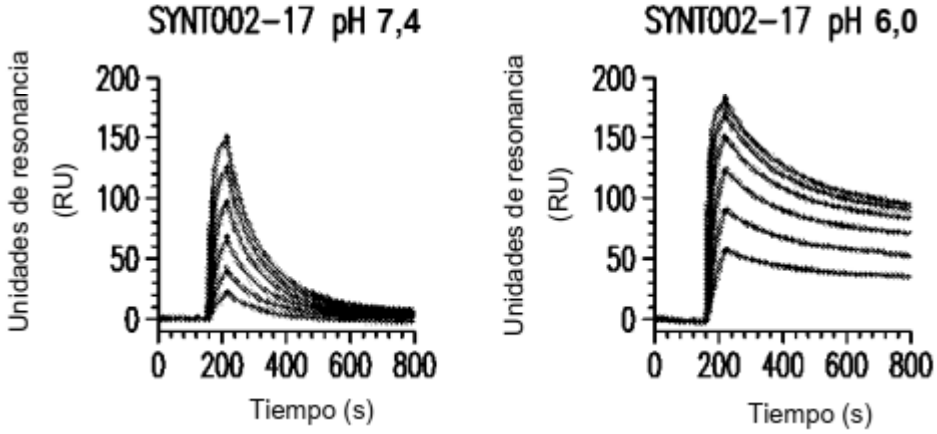

Figura 7E

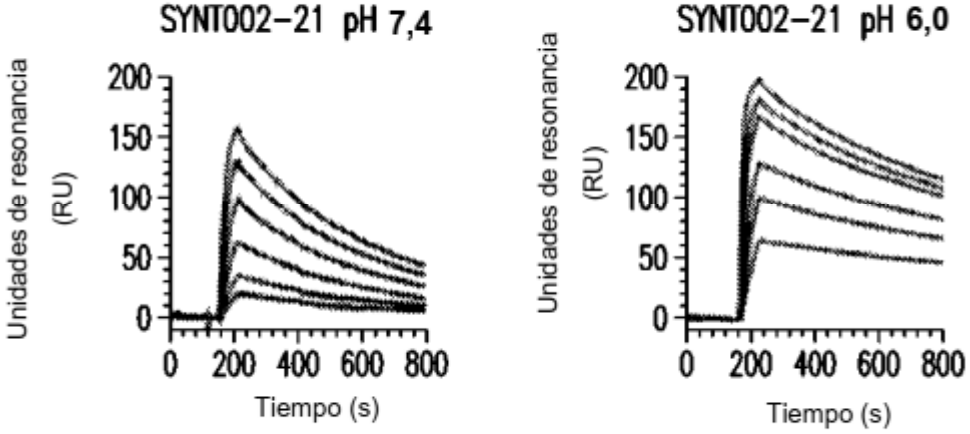

Figura 7F

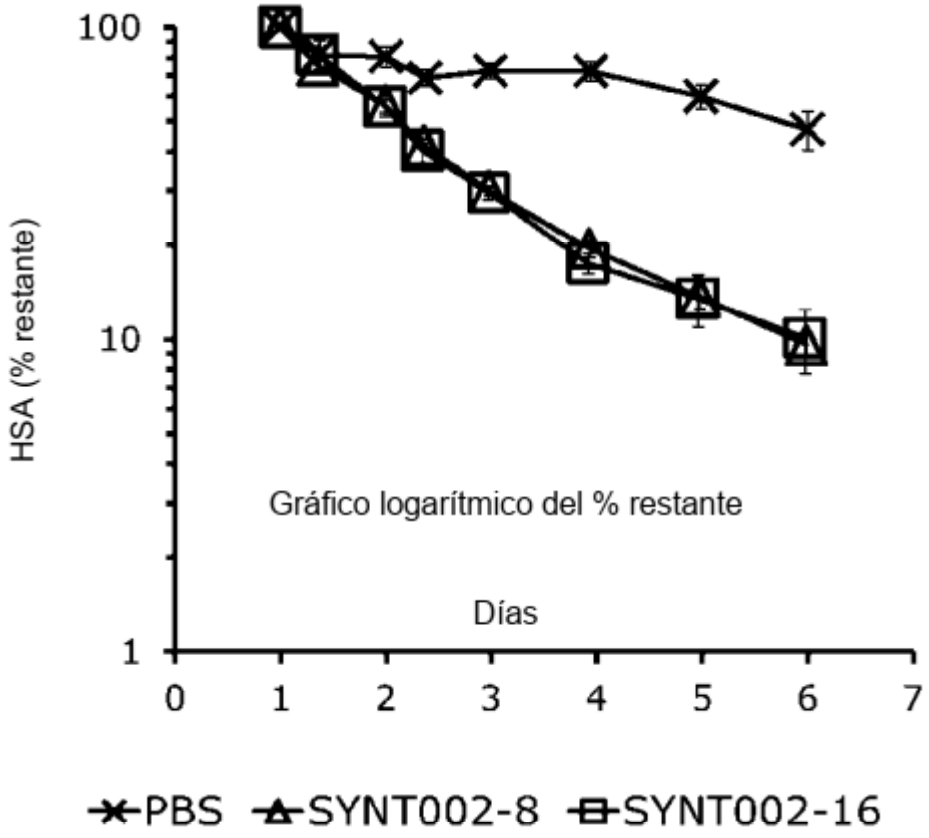

Figura 8A

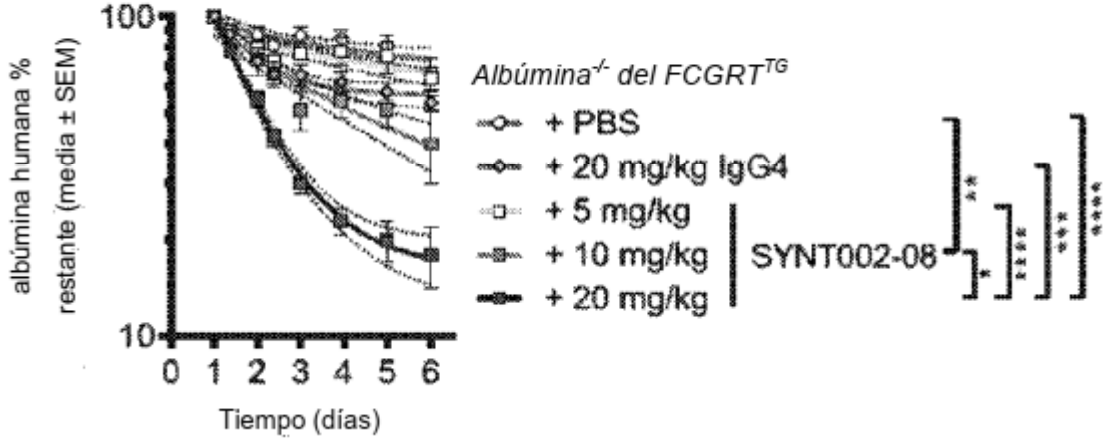

Figura 8B

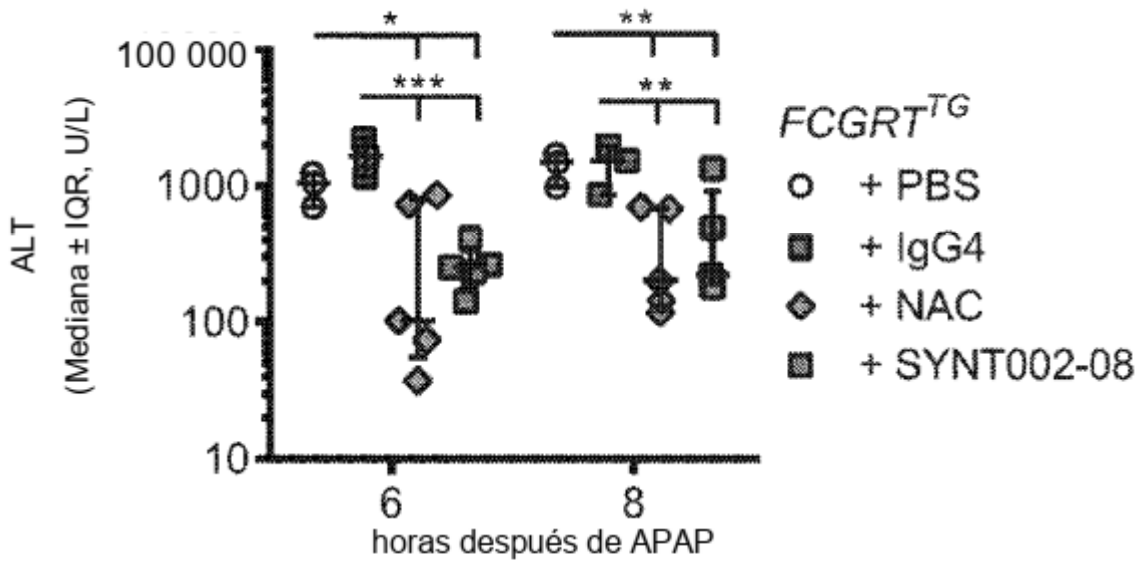
*
**
***
**
100 000
1000
100
10
ALT
(Mediana ± IQR, U/L)
6
8
horas después de APAP
FCGRT^TG
+ PBS
+ IgG4
+ NAC
+ SYNT002-08

Figura 9