

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 004 282**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013** **E 19165269 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025** **EP 3527588**

54 Título: **Anticuerpos anti-FcRn**

30 Prioridad:

14.05.2012 GB 201208370

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2025

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SRL (100.00%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

FINNEY, HELENE MARGARET;
LAWSON, ALASTAIR DAVID GRIFFITHS;
SHAW, STEVAN GRAHAM;
SMITH, BRYAN JOHN;
TYSON, KERRY LOUISE;
KEVORKIAN, LARA;
MEIER, CHRISTOPH;
ATHERFOLD, PAUL ALAN y
SARKAR, KAUSHIK

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 004 282 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-FcRn

- 5 La divulgación se refiere a anticuerpos específicos para FcRn, formulaciones que comprenden los mismos, uso de cada uno en terapia, procesos para expresar y, opcionalmente, formular dicho anticuerpo, ADN que codifica los anticuerpos y hospedadores que comprenden dicho ADN.

FcRn es un complejo no covalente de la cadena α de FcRn de la proteína de membrana y $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$).

- 10 En mamíferos adultos, FcRn desempeña un papel clave en el mantenimiento de los niveles de anticuerpos séricos mediante la actuación como un receptor que se une y recupera los anticuerpos del isotipo IgG. Las moléculas de IgG son endocitadas por las células endoteliales, y si se unen a FcRn, se reciclan y transcitositan, por ejemplo, a la circulación. Por el contrario, las moléculas de IgG que no se unen a FcRn entran en las células y se dirigen a la vía lisosomal donde se degradan. Una variante IgG1 en la que His435 se muta a alanina da como resultado la pérdida selectiva de la unión de FcRn y una semivida en suero significativamente reducida (Firan et al. 2001, International Immunology 13:993).

Se plantea la hipótesis de que FcRn es una posible diana terapéutica para ciertos trastornos autoinmunitarios causados, al menos en parte, por autoanticuerpos. El tratamiento actual para algunos de dichos trastornos incluye la plasmaféresis. A veces, la plasmaféresis se emplea junto con la terapia inmunosupresora para el tratamiento a largo plazo de la enfermedad. El intercambio de plasma ofrece la respuesta a corto plazo más rápida para eliminar los autoanticuerpos dañinos. Sin embargo, también puede ser deseable suprimir la producción de autoanticuerpos mediante el sistema inmunitario, por ejemplo, mediante el uso de medicamentos como prednisona, ciclofosfamida, ciclosporina, micofenolato de mofetilo, rituximab o una mezcla de estos.

- 25 Los ejemplos de enfermedades que se pueden tratar con plasmaféresis incluyen: síndrome de Guillain-Barre; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; síndrome de Goodpasture; síndromes de hiperviscosidad; crioglobulinemia; paraproteinemia; macroglobulinemia de Waldenström; miastenia grave; púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)/síndrome urémico hemolítico; granulomatosis de Wegener; síndrome de Lambert-Eaton; síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS o APLS); poliangiitis microscópica; glomerulosclerosis focal y segmentaria recurrente en el riñón trasplantado; síndrome de HELLP; síndrome de PANDAS; enfermedad de Refsum; síndrome de Behcet; neuropatía relacionada con el VIH; enfermedad de Graves en lactantes y neonatos; pénfigo vulgar; esclerosis múltiple, rabdomiolisis y enfermedades aloinmunitarias.

- 35 La plasmaféresis se usa a veces como terapia de rescate para la eliminación de terapias que contienen Fc, por ejemplo, en emergencias para reducir los efectos secundarios graves.

Aunque la plasmaféresis es útil en ciertas afecciones médicas, existen posibles riesgos y complicaciones asociados con la terapia. La inserción de un catéter intravenoso bastante grande puede provocar sangrado, punción pulmonar (según el lugar de inserción del catéter) y, si se deja el catéter demasiado tiempo, puede provocar una infección y/o daño en las venas, lo que brinda una oportunidad limitada para repetir el procedimiento.

- 45 El procedimiento tiene otras complicaciones asociadas con él, por ejemplo, cuando la sangre de un paciente se encuentra fuera del cuerpo y pasa a través del instrumento de plasmaféresis, la sangre tiene una tendencia a coagularse. Para reducir esta tendencia, en un protocolo común, se infunde citrato mientras la sangre corre por el circuito. El citrato se une al calcio en la sangre, siendo el calcio esencial para que la sangre se coagule. El citrato es muy eficaz para prevenir la coagulación de la sangre; sin embargo, su uso puede llevar a niveles de calcio potencialmente mortales. Esto se puede detectar utilizando el signo de Chvostek o el signo de Trousseau. Para evitar esta complicación, el calcio se infunde por vía intravenosa mientras el paciente se está sometiendo a la plasmaféresis; además, también se puede administrar suplementos de calcio por vía oral.

Otras complicaciones del procedimiento incluyen: hipotensión; posible exposición a hemoderivados, con riesgo de reacciones a la transfusión o enfermedades transmitidas por la transfusión, supresión del sistema inmunitario del paciente y hemorragia o hematoma por la colocación de la aguja.

- 55 Además, las instalaciones que proporcionan plasmaféresis son limitadas y el procedimiento es muy costoso.

Una alternativa a la plasmaféresis es la inmunoglobulina intravenosa (IVIG), que es un producto sanguíneo que contiene IgG policlonal combinada extraída del plasma de más de mil donantes de sangre. La terapia se administra por vía intravenosa y dura entre 2 semanas y 3 meses.

- 60 Las complicaciones del tratamiento con IVIG incluyen dolores de cabeza, dermatitis, infección vírica por contaminación del producto terapéutico, por ejemplo, VIH o hepatitis, edema pulmonar, reacciones alérgicas, insuficiencia renal aguda, trombosis venosa y meningitis aséptica.

65 Por lo tanto, existe una importante necesidad no satisfecha de terapias para los trastornos autoinmunitarios que son

menos invasivos y que exponen a los pacientes a menos complicaciones médicas.

Por lo tanto, existe una importante necesidad no satisfecha de terapias para las enfermedades inmunitarias y/o trastornos autoinmunitarios que son menos invasivos y que exponen a los pacientes a menos complicaciones médicas.

5 Por consiguiente, los agentes que inhiben o reducen la unión de IgG a FcRn pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de dichas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Los anticuerpos anti-FcRn se han descrito previamente en los documentos WO2009/131702, WO2007/087289, WO2006/118772, US2007/092507 A1, WO/2005/013912, Christianson et al., ("Monoclonal antibodies directed against human FcRn and their applications", 10 MABS, (2012), vol. 4, n.º 2) y Getman et al., ("*Pharmacokinetic effects of 4C9, an anti-FcRn antibody, in rats: implications for the use of FcRn inhibitors for the treatment of humoral autoimmune and alloimmune conditions*", Journal of Pharmaceutical sciences, (2005), vol. 94, n.º 4). Además, se han descrito previamente nanocuerpos específicos de FcRn en el documento WO2009/080764.

15 Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de mejorar los anticuerpos anti-FcRn.

Sumario de la invención

20 Por lo tanto, en un aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo que comprende una cadena pesada o fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende tres CDR en donde la CDR H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, la CDR H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y la CDR H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3, y en donde el anticuerpo o fragmento de unión a FcRn del mismo comprende además una cadena ligera o fragmento de 25 cadena ligera que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende tres CDR, en donde la CDR L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, la CDR L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y la CDR L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6.

30 Los anticuerpos de la divulgación inhiben la unión de IgG a FcRn y se piensa que son útiles para reducir una o más funciones biológicas de FcRn, incluida la reducción de la semivida de los anticuerpos circulantes. Esto puede ser beneficioso porque le permite al paciente eliminar más rápidamente los anticuerpos, tales como los autoanticuerpos.

35 Es importante destacar que los anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse a FcRn humano a pH 6 y pH 7,4 con afinidad de unión comparable y alta. De manera ventajosa, por lo tanto, los anticuerpos son capaces de continuar uniéndose a FcRn incluso dentro del endosoma, maximizando así la inhibición de la unión de FcRn a IgG, véase la Figura 10 para ver una ilustración del mecanismo.

40 Los anticuerpos o fragmentos de unión de acuerdo con la presente invención comprenden secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 1 a 6, en donde la CDR H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, CDR H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2, CDR H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3, CDR L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, CDR L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y CDR L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6.

45 La divulgación también se extiende a un polinucleótido, tal como ADN, que codifica un anticuerpo o fragmento como se describe en el presente documento.

También se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho polinucleótido.

50 Los métodos para expresar un anticuerpo o fragmento se proporcionan en el presente documento, ya que son métodos para conjugar un anticuerpo o fragmento con un polímero, tal como PEG.

La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y fragmentos.

55 La presente invención también se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión para su uso en un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, fragmento o composición como se describe en el presente documento.

60 La presente invención también se extiende a un anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente invención para su uso en tratamiento, particularmente en el tratamiento de un trastorno inmunitario y/o autoinmunitario.

Los anticuerpos y fragmentos eliminan la IgG patógena, que se logra mediante la aceleración del mecanismo natural del cuerpo para catabolizar IgG.

65 En esencia, los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la divulgación inhiben el sistema que recicla la IgG en el cuerpo.

Es probable que la terapia actual proporcione un reemplazo o un suplemento para ciertas enfermedades donde la plasmaféresis es una terapia o terapia de IVlg, que es ventajosa para los pacientes.

5 Detalles de la divulgación

FcRn, como se emplea en el presente documento, se refiere al complejo no covalente entre la cadena alfa del receptor de IgG humano, también conocido como el receptor Fc neonatal, cuya secuencia de aminoácidos se encuentra en UniProt con el número P55899 junto con $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$), cuya secuencia de aminoácidos se encuentra en UniProt con el número P61769.

La molécula de anticuerpo como se emplea en el presente documento se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión del mismo.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a anticuerpos inalterados (completos), es decir, que comprenden los elementos de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. El anticuerpo puede comprender además dominios de unión adicionales, por ejemplo, según la molécula DVD-Ig como se describe en el documento WO 2007/024715, o el denominado (FabFv)₂Fc descrito en el documento WO2011/030107. Por lo tanto, el anticuerpo tal como se emplea en el presente documento incluye anticuerpos de longitud completa bi, tri o tetraivalentes.

Los fragmentos de unión de los anticuerpos incluyen anticuerpos de cadena única (es decir, una cadena pesada y una cadena ligera de longitud completa); Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetraivalentes, Bis-scFv, diacuerpos, tricuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). El formato Fab-Fv se desveló por primera vez en el documento WO2009/040562 y las versiones estabilizadas con disulfuro del mismo, el Fab-dsFv se desveló por primera vez en el documento WO2010/035012, véase también la Figura 25 en el presente documento. Otros fragmentos de anticuerpo para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, biespecífico o puede ser monoespecífico (véase, por ejemplo, los documentos WO 92/22583 y WO05/113605). Un ejemplo de este último es un Tri-Fab (o TFM) como se describe en el documento WO92/22583.

Una molécula Fab' típica comprende un par de cadenas pesadas y ligeras en las que la cadena pesada comprende una región variable V_H, un dominio constante C_{H1} y una región bisagra natural o modificada y la cadena ligera comprende una región variable V_L y un dominio constante C_L.

Se proporciona un dímero de un Fab' de acuerdo con la presente divulgación para crear un F(ab')₂, por ejemplo, la dimerización puede ser a través de la bisagra.

El anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende un dominio de unión que comprende 6 CDR, tres de una cadena pesada y tres de una cadena ligera. Las CDR están en un marco y juntas forman una región variable. Por lo tanto, un anticuerpo o fragmento de unión comprende un dominio de unión específico para antígeno que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada.

Se apreciará que una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) pueden hacerse a las CDR u otras secuencias (por ejemplo, dominios variables) proporcionadas por la presente divulgación sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a FcRn. Un experto en la técnica puede probar fácilmente el efecto de cualquier sustitución, adición y/o eliminación de aminoácidos, por ejemplo, mediante la utilización de los métodos descritos en el presente documento, en particular en los Ejemplos, para determinar FcRn.

Se pueden realizar sustituciones, adiciones y/o deleciones en uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) en la región marco empleada en el anticuerpo o fragmento proporcionado por la presente divulgación y en donde se conserva o aumenta la afinidad de unión a FcRn.

Los restos en los dominios variables de anticuerpos se numeran convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se describe en Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. (en adelante "Kabat *et al.* (*supra*)"). Este sistema de numeración se utiliza en la presente descripción detallada, salvo que se indique lo contrario.

Las designaciones de restos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos

adicionales que en la numeración de Kabat estricta correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, ya sea un marco o una región determinante de complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico. La numeración correcta de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

Las CDR del dominio variable de cadena pesada están ubicadas en los restos 31-35 (CDR-H1), los restos 50-65 (CDR-H2) y los restos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el resto 26 hasta el resto 32. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, "CDR-H1", tal como se emplea en el presente documento, pretende referirse a los restos 26 a 35, como se describe en una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición del bucle topológico de Chothia.

Las CDR del dominio variable de cadena ligera están ubicadas en los restos 24-34 (CDR-L1), los restos 50-56 (CDR-L2) y los restos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación inhiben FcRn y, por lo tanto, pueden evitar que funcione en el reciclado de IgG. La inhibición, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una inhibición física, tal como ocluir el receptor, pero también incluirá dónde se unen el anticuerpo o fragmentos a un epítipo que causa, por ejemplo, un cambio conformacional que significa que ya no se une el ligando natural al receptor. Las moléculas de anticuerpos de la presente invención se unen a FcRn y, por lo tanto, disminuyen o evitan (por ejemplo, inhiben) la unión de FcRn a una región constante de IgG.

El anticuerpo o fragmento del mismo se une a FcRn competitivamente con respecto a IgG.

En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo funciona como un inhibidor competitivo de la unión de FcRn humano a IgG humana. En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une al sitio de unión de IgG en FcRn. En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo no se une a β 2M.

Los anticuerpos para su uso en la presente divulgación pueden obtenerse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Las proteínas de fusión que incluyen el polipéptido/proteína FcRn, células (recombinantes o naturales) que expresan el polipéptido (tal como los linfocitos T activados) se pueden usar para producir anticuerpos que reconocen específicamente FcRn. El polipéptido puede ser el polipéptido "maduro" o un fragmento o derivado biológicamente activo del mismo. La proteína humana está registrada en Swiss-Prot con el número P55899. El dominio extracelular de la cadena alfa de FcRn humano se proporciona en la SEQ ID NO: 94. La secuencia de β 2M se proporciona en la SEQ ID NO: 95.

El antígeno puede ser una forma mutante de FcRn que está diseñada para presentar FcRn en la superficie de una célula, de manera que hay poco o ningún procesamiento dinámico donde FcRn se internaliza en la célula, por ejemplo, esto se puede lograr mediante una mutación en la cola citoplásmica de la cadena alfa de FcRn, en donde la dileucina se muta a alanina como se describe en Ober et al., 2001 Int. Immunol. 13, 1551-1559.

Los polipéptidos, para su uso para inmunizar un hospedador, pueden prepararse mediante procesos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedadoras modificadas por ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptido" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se usan indistintamente a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido FcRn puede ser, en algunos casos, parte de una proteína más grande, como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada con un marcador de afinidad o similar.

Los anticuerpos generados contra el polipéptido FcRn pueden obtenerse, cuando sea necesaria la inmunización de un animal, mediante la administración de los polipéptidos a un animal, preferentemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, ratones, conejos, cerdos y ratas son generalmente los más adecuados.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, págs. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden generarse usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y expresión de ADNc de región variable de inmunoglobulinas generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848; el documento WO92/02551; el documento WO2004/051268 y la solicitud de patente internacional número WO2004/106377.

La selección de anticuerpos se puede realizar utilizando ensayos para medir la unión a FcRn humano y/o ensayos para medir la capacidad de inhibir la unión de IgG al receptor. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, que utiliza una proteína de fusión de FcRn humano y Fc humano, que se inmoviliza en placas, y que emplea un anticuerpo secundario para detectar el anticuerpo anti-FcRn unido a la proteína de fusión. Los ejemplos de ensayos antagonistas y de inhibición adecuados se describen en los Ejemplos en el presente documento.

Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos injertados con CDR) son moléculas de anticuerpos que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, los documentos US 5.585.089; WO91/09967). Se apreciará que solo puede ser necesario transferir la especificidad que determina los restos de las CDR en lugar de la CDR completa (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden opcionalmente comprender además uno o más restos marco procedentes de la especie no humana de la que procedían las CDR. Estos últimos se denominan a menudo restos de donantes.

Específico, tal como se emplea en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que solo reconoce el antígeno para el que es específico o a un anticuerpo que tiene una afinidad de unión significativamente mayor al antígeno para el que es específico en comparación con la unión a antígenos para los que no es específico, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de unión. La afinidad de unión puede medirse mediante técnicas tales como BIAcore como se describe en el presente documento a continuación. En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención no se une a la $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$). En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención se une a FcRn de macaco. En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención no se une a FcRn de rata o ratón.

Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de polinucleótidos de ciertos anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación se proporcionan en las Figuras.

En una realización, el anticuerpo o fragmentos de acuerdo con la divulgación están humanizados.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo no humano tal como un anticuerpo monoclonal murino) injertado en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En un aspecto de la divulgación, en lugar de que se transfiera la CDR completa, solo uno o más de los restos que determinan la especificidad de una cualquiera de las CDR descritas anteriormente en el presente documento se transfieren al marco del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). En un aspecto de la divulgación, solo los restos que determinan la especificidad de una o más de las CDR descritas en el presente documento anteriormente se transfieren al marco del anticuerpo humano. En otro aspecto de la divulgación, solo los restos que determinan la especificidad de cada una de las CDR descritas en el presente documento anteriormente se transfieren al marco del anticuerpo humano.

Cuando se injertan las CDR o los restos que determinan la especificidad, se puede usar cualquier secuencia marco de la región variable aceptora apropiada con respecto a la clase/tipo del anticuerpo donante del que proceden las CDR, incluidas las regiones marco de ratón, primate y ser humano.

Adecuadamente, el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marco aceptoras humanas, así como las CDR proporcionadas específicamente en el presente documento. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo humanizado de inhibición que se une a FcRn humano en el que el dominio variable comprende regiones marco de humanas y CDR de donante no humano.

Ejemplos de marcos humanos que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., supra). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Como alternativa, pueden usarse secuencias de la línea germinal humana; estas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las cadenas pesada y ligera aceptoras no necesitan necesariamente proceder del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas que tienen regiones marco procedentes de diferentes cadenas.

Dicha región marco adecuada para la cadena pesada del anticuerpo humanizado de la presente invención procede de la secuencia 1-3 3-07 del subgrupo VH3 humano junto con JH4 (SEQ ID NO: 56).

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID

NO: 3 para CDRH3, en el que la región marco de la cadena pesada procede de la secuencia 1-3 3-07 del subgrupo VH3 humano junto con JH4.

La secuencia de JH4 humano es como sigue: (YFDY)WGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 70). El motivo YFDY es parte de CDR-H3 y no es parte del marco 4 (Ravetch, JV. et al., 1981, Cell, 27, 583-591).

En un ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 29.

Una región marco adecuada para la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la presente invención procede de la secuencia 2-1-(1) A30 del subgrupo VK1 de la línea germinal humana junto con JK2 (SEQ ID NO: 54).

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDRL3, en el que la región marco de la cadena ligera procede de la secuencia 2-1-(1) A30 del subgrupo VK1 humano junto con JK2.

La secuencia de JK2 es como sigue: (YT)FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 71). El motivo YT es parte de CDR-L3 y no es parte del marco 4 (Hieter, PA., et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522).

En un ejemplo, el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los restos inusuales se pueden cambiar a restos de origen frecuentes para esa clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, los restos seleccionados en las regiones marco aceptoras pueden cambiarse de manera que correspondan al resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Dichos cambios se deben mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En el documento WO91/09967 se expone un protocolo para seleccionar restos en las regiones marco aceptoras que puede ser necesario cambiar.

Por lo tanto, en una realización, 1, 2, 3, 4 o 5 restos en el marco se reemplazan con un resto de aminoácido alternativo.

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado, en el que al menos los restos en cada una de las posiciones 3, 24, 76, 93 y 94 del dominio variable de la cadena pesada (numeración de Kabat) son restos donantes, véase, por ejemplo, la secuencia dada en la SEQ ID N°: 29.

En una realización, el resto 3 del dominio variable de cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, glutamina.

En una realización, el resto 24 del dominio variable de cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, alanina.

En una realización, el resto 76 del dominio variable de cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, asparagina.

En una realización, el resto 93 de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, alanina.

En una realización, el resto 94 de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, arginina.

En una realización, el resto 3 es glutamina, el resto 24 es alanina, el resto 76 es asparagina, el resto 93 es alanina y el resto 94 es arginina en la región variable de la cadena pesada humanizada de acuerdo con la presente divulgación.

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado, en el que al menos los restos en cada una de las posiciones 36, 37 y 58 del dominio variable de la cadena ligera (numeración de Kabat) son restos de donante, véase, por ejemplo, la secuencia dada en la SEQ ID N°: 15.

En una realización, el resto 36 del dominio variable de cadena ligera se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, tirosina.

En una realización, el resto 37 del dominio variable de cadena ligera se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, glutamina.

En una realización, el resto 58 del dominio variable de cadena ligera se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, valina.

- 5 En una realización, el resto 36 es tirosina, el resto 37 es glutamina y el resto 58 es valina, en la región variable de la cadena pesada humanizada de acuerdo con la presente divulgación.

La divulgación proporciona una secuencia de anticuerpo que es similar o idéntica al 80 % de una secuencia desvelada en el presente documento, por ejemplo, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % sobre una parte o la totalidad de la secuencia en cuestión, por ejemplo, una
10 secuencia de dominio variable, una secuencia CDR o una secuencia de dominio variable, excluyendo las CDR. En un aspecto de la divulgación, la secuencia en cuestión es la SEQ ID NO: 15. En un aspecto de la divulgación, la secuencia en cuestión es la SEQ ID NO: 29.

15 La presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que se une a FcRn humano que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 29.

20 La presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que se une a FcRn humano que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15.

25 La presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que se une a FcRn humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada que es al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % similar o idéntico a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 29 pero en donde la molécula de anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

30 La presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que se une a FcRn humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena ligera que es al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % similar o idéntico a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 pero en donde la molécula de anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

La presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que se une a FcRn humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada que es al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % similar o idéntico a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 29 y un dominio variable
40 de cadena ligera que es al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % similar o idéntico a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 pero en donde la molécula de anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

45 "Identidad", como se utiliza en el presente documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se utiliza en el presente documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos
50 que a menudo se pueden sustituir entre sí incluyen, pero sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- 55 - asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el software BLAST™ disponible de NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656,).

65 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que

tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas y puede ser, pero sin limitación, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23 (9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, biespecífico o puede ser monoespecífico (véase, por ejemplo, los documentos WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un fragmento Fab' de anticuerpo que comprende las regiones variables mostradas en las SEQ ID NO: 15 y 29, por ejemplo, para la cadena ligera y pesada respectivamente. En una realización, la molécula de anticuerpo tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 22 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 36.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo IgG1 de longitud completa que comprende las regiones variables mostradas en las SEQ ID NO: 15 y 29, por ejemplo, para la cadena ligera y pesada respectivamente. En una realización, la molécula de anticuerpo tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 22 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 72.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un formato de IgG4 de longitud variable que comprende las regiones variables mostradas en las SEQ ID NO: 15 y 29, por ejemplo, para la cadena ligera y pesada respectivamente. En una realización, la molécula de anticuerpo tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 22 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 87.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un formato de IgG4P de longitud variable que comprende las regiones variables mostradas en las SEQ ID NO: 15 y 29, por ejemplo, para la cadena ligera y pesada respectivamente. En una realización, la molécula de anticuerpo tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 22 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 43.

IgG4P, tal como se emplea en el presente documento, es una mutación del isotipo IgG4 de tipo silvestre donde el aminoácido 241 se reemplaza por la prolina, véase, por ejemplo, donde la serina en la posición 241 se cambió a prolina como se describe en Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se proporciona como una proteína de fusión de anticuerpo de unión a FcRn que comprende una fracción de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAc) unidos directa o indirectamente al mismo, por ejemplo, como se describe en los documentos WO2009/040562, WO2010035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y WO2011/086091.

En una realización, la proteína de fusión comprende dos dominios de anticuerpo, por ejemplo, como un emparejamiento de variable de cadena pesada (VH) y variable de cadena ligera (VL), opcionalmente unidos por un enlace disulfuro.

En una realización, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma o similar especificidad al anticuerpo o anticuerpos de dominio único. En una realización, el Fab o Fab' tiene una especificidad diferente al anticuerpo o anticuerpos de dominio único, es decir, la proteína de fusión es multivalente. En una realización, una proteína de fusión multivalente de acuerdo con la presente invención tiene un sitio de unión a albúmina, por ejemplo, un par VH/VL en el mismo proporciona un sitio de unión a albúmina. En una de dichas realizaciones, la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 50 y la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 46 o la SEQ ID NO: 78. Este formato Fab-dsFv se ilustra en la Figura 25 en el presente documento.

En una realización, el Fab o Fab' de acuerdo con la presente divulgación se conjuga con una molécula PEG o albúmina de suero humano.

CA170_01519 g57 y 1519 y 1519.g57 se emplean de manera intercambiable en el presente documento y se usan para referirse a un par específico de regiones variables de anticuerpos que se pueden usar en varios formatos diferentes. Estas regiones variables son la secuencia de la cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 29 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 15 (Figura 1).

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que pueden ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se pueden usar dominios de región constante de IgG humana,

especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Como alternativa, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Se apreciará que también se pueden usar variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, las moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108 pueden usarse. Un experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos pueden sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones a menudo dependen de la línea de la célula hospedadora utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glucosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un resto básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo puede estar ausente.

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

En una realización, la cadena ligera tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 22 y la cadena pesada tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 43.

En una realización, la cadena ligera tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 22 y la cadena pesada tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 72.

En una realización, un aminoácido C-terminal de la molécula de anticuerpo se escinde durante las modificaciones postraduccionales.

En una realización, un aminoácido N-terminal de la molécula de anticuerpo se escinde durante las modificaciones postraduccionales.

La presente divulgación también proporciona una región específica o epítipo de FcRn humano que está unido por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular, un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada gH20 (SEQ ID NO: 29) y/o la secuencia de la cadena ligera gL20 (SEQ ID NO: 15).

Esta región o epítipo específico del polipéptido FcRn humano se puede identificar mediante cualquier método de mapeo de epítopos adecuado conocido en la técnica en combinación con uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de dichos métodos incluyen la selección de péptidos de longitudes variables procedentes de FcRn para unirse al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que se puede unir específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos FcRn pueden producirse sintéticamente o mediante digestión proteolítica del polipéptido FcRn. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar mediante, por ejemplo, análisis espectrométrico de masas. En otro ejemplo, se puede usar la espectroscopía de RMN o la cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención se puede usar, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítipo.

En una realización, el anticuerpo de la presente divulgación se une a la secuencia extracelular de la cadena alfa de FcRn humano como se muestra a continuación:

AESHLSELLYH LTAVSSPAPG TPAFWVSGWL GPQQYLSYNS LRGEAEPCGA
WVWENQVSWY WEKETDRLRI KEKLFLEAFK ALGGKOPYTL QGLLGCELP
DNTSVPTAKF ALNGEEFMNF **DLKQGTWGGD WPEALAISQR WQQQDKAANK**

ELTFLLFSCP HRLREHLERG RGNLEWKEPP SMRLKARPSS PGFSVLTCSA
FSFYPPQLQL RFLRNGLAAG TGQGDFGPNS DGSFHASSSL TVKSGDEHHY
CCIVQHAGLA QPLRVELESPAKSS (SEQ ID NO: 94).

Los restos subrayados son aquellos que se sabe que son importantes para la interacción de FcRn humano con la región Fc de la IgG humana y los restos resaltados en negrita son aquellos implicados en la interacción de FcRn con el anticuerpo 1519 de la presente divulgación que comprende la secuencia de la cadena pesada gH20 (SEQ ID NO: 29) y la secuencia de la cadena ligera gL20 (SEQ ID NO: 15).

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los restos V105,

P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO: 94 y al menos un resto, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos seleccionados del grupo que consiste en P100, E115, E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124, G128, G129, D130, W131, P132 y E133 de la SEQ ID NO: 94.

- 5 En un ejemplo, el epítipo de la molécula de anticuerpo se determina mediante cristalografía de rayos X utilizando la secuencia extracelular de la cadena alfa de FcRn (SEQ ID NO: 94) en complejo con β 2M.

- 10 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los restos V105, P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO: 94 y al menos un resto, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos, seleccionados del grupo que consiste en E115, E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123 y Q124 de la SEQ ID NO: 94.

- 15 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los restos V105, P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO:94 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en E115, E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123 y Q124 de la SEQ ID NO: 94.

- 20 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los restos V105, P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO:94 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en P100, E115, E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124, G128, G129, D130, W131, P132 y E133 de la SEQ ID NO: 94.

- 25 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los restos V105, P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO:94 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en P100, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124 y G128 de la SEQ ID NO: 94.

- 30 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende los restos V105, P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO:94 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en P100, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124 y G128 de la SEQ ID NO: 94.

- 35 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende los restos V105, P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO:94 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en P100, E115, E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124, G128, G129, D130, W131, P132 y E133 de la SEQ ID NO: 94.

- 40 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende los restos P100, V105, P106, T107, A108 y K109 de la SEQ ID NO:94 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en E115, E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124, G128, G129, D130, W131, P132 y E133 de la SEQ ID NO: 94.

- 45 En un ejemplo "al menos un resto" puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 restos.

- 50 En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que se une a un epítipo de FcRn humano que comprende o consiste en los restos 100, 105 a 109, 115 a 124 y 129 a 133 de la SEQ ID NO: 94.

- 55 Anticuerpos que inhiben de manera cruzada la unión de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, en particular, una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 29 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 15 pueden ser igualmente útiles en la inhibición de la actividad de FcRn. Por consiguiente, la presente descripción también proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn, que inhibe de manera cruzada la unión de una cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas anteriormente en el presente documento a FcRn humano y/o está inhibida de manera cruzada para unirse a FcRn humano mediante uno cualquiera de esos anticuerpos. En un aspecto de la divulgación, dicho anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito anteriormente en el presente documento. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo neutralizante de inhibición cruzada se une a un epítipo que bordea y/o se superpone con el epítipo unido por un anticuerpo descrito anteriormente en el presente documento.
- 60

- 65 Los anticuerpos de inhibición cruzada se pueden identificar utilizando cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo, mediante la utilización de ensayos BIAcore o ELISA de competición donde la unión del anticuerpo de inhibición cruzada a FcRn humano evita la unión de un anticuerpo de la presente invención o viceversa. Dichos ensayos de inhibición cruzada pueden usar FcRn natural o recombinante aislado o una proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, la unión y la inhibición cruzada se miden utilizando el dominio extracelular de FcRn

humano recombinante (SEQ ID NO: 94). En un ejemplo, el dominio extracelular de la cadena alfa de FcRn humano recombinante se usa en un complejo con $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) (SEQ ID NO: 95).

Se proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que inhibe la unión de FcRn a IgG y que inhibe de manera cruzada la unión de un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 29 y cuya cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 a FcRn humano. En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos de inhibición cruzada proporcionados por la presente divulgación inhiben la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 29 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 15 en más del 80 %, por ejemplo, en más del 85 %, tal como en más del 90 %, en particular, en más del 95 %.

Como alternativa o además, los anticuerpos anti-FcRn de acuerdo con este aspecto de la divulgación pueden inhibir de manera cruzada la unión a FcRn humano por un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 29 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 15. Por lo tanto, también se proporciona una molécula de anticuerpo anti-FcRn que inhibe la unión de FcRn a IgG y que está inhibida de manera cruzada para unirse a FcRn humano por un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 29 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 15. Los anticuerpos anti-FcRn proporcionados por este aspecto de la divulgación están inhibidos de unirse a FcRn humano por un anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 29 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 15 en más del 80 %, por ejemplo, en más del 85 %, tal como en más del 90 %, en particular, en más del 95 %.

En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos de inhibición cruzada proporcionados por la presente divulgación son completamente humanos. En un aspecto, los anticuerpos de inhibición cruzada proporcionados por la presente divulgación están humanizados. En un aspecto, los anticuerpos de inhibición cruzada proporcionados por la presente divulgación tienen una afinidad por FcRn humano de 100 pM o menos. En un aspecto, los anticuerpos de inhibición cruzada proporcionados por la presente divulgación tienen una afinidad por FcRn humano de 50 pM o menos. La afinidad se puede medir utilizando los métodos descritos en el presente documento a continuación.

Las moléculas biológicas, como los anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, lo que le da a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga "observada" global dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoelectrico (pI) es el pH en el que una molécula particular o una superficie accesible al solvente de la misma no tiene carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo FcRn y fragmentos de la invención pueden diseñarse para tener un punto isoelectrico apropiado. Esto puede conducir a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más consistentes, en particular perfiles adecuados de solubilidad y/o estabilidad y/o características mejoradas de purificación.

La divulgación proporciona un anticuerpo FcRn humanizado diseñado para tener un punto isoelectrico diferente al del anticuerpo identificado originalmente. El anticuerpo puede, por ejemplo, diseñarse mediante la sustitución de un resto de aminoácido, tal como la sustitución de un resto de aminoácido ácido con uno o más restos de aminoácidos básicos. Como alternativa, pueden introducirse restos de aminoácidos básicos o pueden eliminarse restos de aminoácidos ácidos. Como alternativa, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente alto, se pueden introducir restos ácidos para disminuir el pI, según sea necesario. Es importante que cuando se manipula el pI se debe tener cuidado para conservar la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Por lo tanto, en un aspecto de la divulgación, el anticuerpo o fragmento diseñado mediante ingeniería genética tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Programas como ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html y http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, se puede usar para predecir el punto isoelectrico del anticuerpo o fragmento.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una alta afinidad de unión, en particular, en el intervalo nanomolar. La afinidad puede medirse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluido BIAcore, como se describe en los Ejemplos en el presente documento, utilizando FcRn natural o recombinante aislado o una proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, la afinidad se mide utilizando el dominio extracelular de FcRn humano recombinante como se describe en los Ejemplos en el presente documento (SEQ ID NO: 94). En un ejemplo, la afinidad se mide utilizando el dominio extracelular de la cadena alfa de FcRn humano (SEQ ID NO: 94) en asociación con la $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) (SEQ ID NO: 95). Adecuadamente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por FcRn humano aislado de aproximadamente 1 nM o inferior.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 500 pM o inferior (es decir, una afinidad más alta). En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 250 nM o inferior. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 200 nM o inferior. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-FcRn con una afinidad de unión de

aproximadamente 100 pM o inferior. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-FcRn humanizado con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o inferior. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-FcRn con una afinidad de unión de 50 pM o inferior.

- 5 Es importante destacar que los anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse a FcRn humano a pH 6 y pH 7,4 con afinidad de unión comparable. De manera ventajosa, por lo tanto, los anticuerpos son capaces de continuar uniéndose a FcRn incluso dentro del endosoma, maximizando así la inhibición de la unión de FcRn a IgG, véase la Figura 10 para ver una ilustración del mecanismo.
- 10 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-FcRn con una afinidad de unión de 100 pM o inferior cuando se mide a pH 6 y pH 7,4.

La afinidad de un anticuerpo o fragmento de unión de la presente invención, así como el grado en que un agente de unión (como un anticuerpo) inhibe la unión, se puede determinar por un experto en la técnica usando técnicas convencionales, por ejemplo, aquellas descritas por Scatchard et al. (Ann. KY. Acad. Sci. 51:660-672 (1949)) o por resonancia de plasmones de superficie (SPR, de sus siglas en inglés) utilizando sistemas como BIAcore. Para la resonancia de plasmón de superficie, las moléculas diana se inmovilizan en una fase sólida y se exponen a ligandos en una fase móvil que corre a lo largo de una célula de flujo. Si se produce la unión del ligando a la diana inmovilizada, el índice de refracción local cambia, lo que lleva a un cambio en el ángulo de la SPR, que se puede monitorear en tiempo real mediante la detección de cambios en la intensidad de la luz reflejada. Las velocidades de cambio de la señal de la SPR se pueden analizar para producir constantes de velocidad aparentes para las fases de asociación y disociación de la reacción de unión. La relación de estos valores da la constante de equilibrio aparente (afinidad) (véase, por ejemplo, Wolff et al, Cancer Res. 53:2560-65 (1993)).

- 25 En la presente invención, la afinidad de la molécula de anticuerpo de prueba se determina normalmente usando SPR de la siguiente manera. La molécula de anticuerpo de prueba se captura en la fase sólida y el dominio extracelular de la cadena alfa de FcRn humano en un complejo no covalente con β 2M se ejecuta sobre el anticuerpo capturado en la fase móvil y se determina la afinidad de la molécula de anticuerpo de prueba para FcRn humano. La molécula de anticuerpo de prueba puede capturarse en la superficie del chip en fase sólida utilizando cualquier método apropiado, por ejemplo, utilizando un agente de captura específico anti-Fc o anti-Fab'. En un ejemplo, la afinidad se determina a pH 6. En un ejemplo, la afinidad se determina a pH 7,4.

Se apreciará que la afinidad de anticuerpos proporcionada por la presente invención puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La presente divulgación, por lo tanto, también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por FcRn. Dichas variantes se pueden obtener mediante una serie de protocolos de maduración de afinidad que incluyen la mutación de las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), el intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), el barajado de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), la presentación de fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) la PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391,288-291, 1998). Vaughan et al. (*supra*) discute estos métodos de maduración de afinidad.

En una realización, las moléculas de anticuerpo de la presente invención inhiben la actividad de FcRn humano. Los ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para inhibir FcRn se describen en los Ejemplos en el presente documento. Los ensayos adecuados para determinar si los anticuerpos inhiben la interacción de FcRn con moléculas de IgG circulantes como se describen en los Ejemplos en el presente documento. A continuación se describe, en el presente documento, un ensayo adecuado para determinar la capacidad de una molécula de anticuerpo para inhibir el reciclado de IgG *in vitro*.

- 50 Si se desea, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas unidas de manera que formen una única fracción que se puede unir a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, esto puede prepararse mediante procedimientos químicos estándar o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03/031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, el enlace se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

La expresión molécula efectora como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por

ejemplo, ADN, ARN o fragmentos del mismo, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de RMN o ESR.

- 5 Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, que destruya) las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemisterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-
- 10 deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

- Las moléculas efectoras también incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).
- 15

- 20 Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados, tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 ; o fármacos tales como, pero sin limitación, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

- 25 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento procedente de plaquetas o activador de plasminógeno tisular,
- 30 un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

- 35 Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales emisores de positrones (para su uso en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la Patente de Estados Unidos N.º 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como
- 40 diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, betagalactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los núclidos radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .
- 45

- En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina,
- 50 proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO05/117984.

- En una realización, una semivida proporcionada por una molécula efectora que es independiente de FcRn es ventajosa.
- 55

- Cuando la molécula efectora es un polímero, puede, en general, ser un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo un polialquileño, polialquilenilo o polioxialquileño de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo- o heteropolisacárido.

- 60 Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

- Ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) o poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.
- 65

Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

En una realización, el polímero es albúmina o un fragmento de la misma, tal como albúmina de suero humano o un fragmento de la misma.

Los "derivados", como se usan en el presente documento, pretenden incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos para tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo formará en algunos casos parte del producto como el grupo de enlace entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, en función del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizar ciertos tejidos como tumores o extender la semivida circulante (para una revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por lo tanto, por ejemplo, cuando se pretende que el producto salga de la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo, con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero polialquileño, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

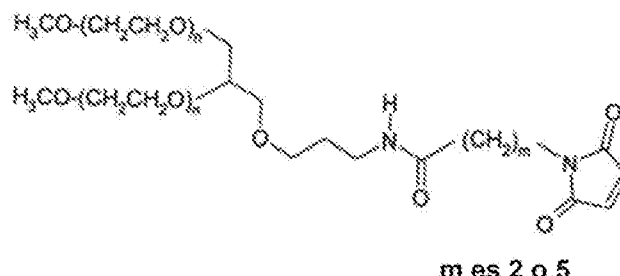
En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención se unen a fracciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional de aminoácidos de cadena lateral o de aminoácido terminal disponible ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden aparecer naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse por ingeniería genética en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, los documentos US 5.219.996; US 5.667.425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada, de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más restos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

Adecuadamente, las moléculas de PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un resto de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína ubicado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Se puede usar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros como se describe anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol, tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente utilizando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado, fragmento Fab' o diFab que está PEGilado, es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, por ejemplo, de acuerdo con el método desvelado en los documentos EP 0948544 o EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un solo grupo tiol en una región bisagra modificada. Un resto de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el resto de lisina puede unirse un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede, por lo tanto, ser aproximadamente 40.000 Da.

Las moléculas de PEG particulares incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etil amida de N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) PM 20.000) lisina modificada, también conocida como PEG2MAL40K (que se puede obtener de Nektar, anteriormente Shearwater).

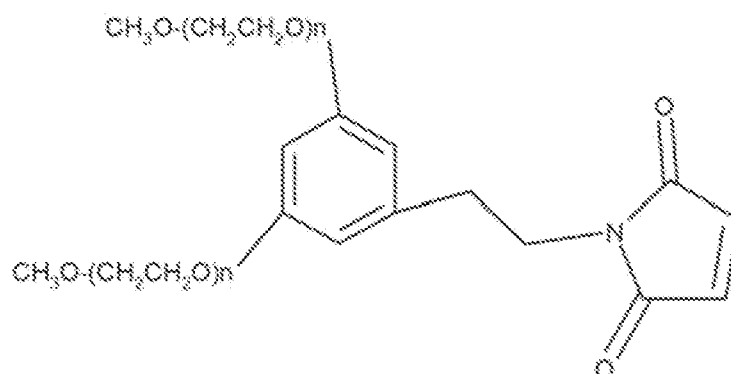
- 5 Las fuentes alternativas de enlazadores PEG incluyen los NOF que suministran GL2-400MA3 (en donde m en la estructura inferior es 5) y GL2-400MA (donde m es 2) y n es aproximadamente 450:



- 10 Es decir, cada PEG tiene aproximadamente 20.000 Da.

Por lo tanto, en una realización, el PEG es 2,3-bis(metilpolioxietileno-oxi)-1-[[3-(6-maleimido-1-oxohexil)amino]propiloxi] hexano (el PEG ramificado de 2 brazos, -CH2) 3NHCO (CH2) 5-MAL, Pm 40.000 conocido como SUNBRIGHT GL2-400MA3.

- 15 Otras moléculas efectoras de PEG alternativas del siguiente tipo:



- 20 están disponibles de Dr. Reddy, NOF y Jenkem.

- En una realización, se proporciona un anticuerpo que está PEGilado (por ejemplo, con un PEG descrito en el presente documento), unido a través de un resto de aminoácido de cisteína en o alrededor del aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo, el aminoácido 226 de la cadena pesada (mediante secuenciación secuencial), por ejemplo el aminoácido 226 de la SEQ ID NO: 36.

- En una realización, la presente divulgación proporciona una molécula de Fab'PEG que comprende uno o más polímeros de PEG, por ejemplo, 1 o 2 polímeros, tales como un polímero o polímeros de 40 kDa.

- 30 Las moléculas de Fab'-PEG de acuerdo con la presente divulgación pueden ser particularmente ventajosas porque tienen una semivida independiente del fragmento Fc. En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-FcRn o un fragmento de unión a FcRn del mismo como se define en el presente documento para su uso en un método para tratar una enfermedad mejorada mediante la inhibición de FcRn humano que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión del mismo tiene una semivida que es independiente de la unión de Fc a FcRn.

- En una realización, se proporciona un Fab' conjugado a un polímero, tal como una molécula de PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

- 40 En una realización, se proporciona un scFv conjugado con un polímero, tal como una molécula de PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

En una realización, el anticuerpo o fragmento se conjuga con una molécula de almidón, por ejemplo, para aumentar la semivida. Los métodos de conjugación de almidón con una proteína como se describen en el documento US 8.017.739.

5 En una realización, se proporciona una molécula de unión anti-FcRn que:

- Causa el 70 % de reducción de la concentración de IgG en plasma,
 - Con no más del 20 % de reducción de la concentración de albúmina en plasma, y/o
 - Con la posibilidad de repetir la dosificación para lograr un mantenimiento a largo plazo de una baja concentración
- 10 de IgG en plasma.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena(s) pesada(s) y/o ligera(s) de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la

15 presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido mediante procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se pueden sintetizar según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

20

El ADN que codifica las secuencias marcoceptoras está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente sobre la base de sus secuencias de aminoácidos conocidas.

25

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Las técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden usar según sea apropiado.

30

En el presente documento se proporcionan ejemplos de secuencias de ADN adecuadas.

Ejemplos de secuencias de ADN adecuadas que codifican la región variable de cadena ligera de 1519 se proporcionan en la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 90. Ejemplos de secuencias de ADN adecuadas que codifican la región variable de cadena pesada de 1519 se proporcionan en la SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 92.

35

Ejemplos de secuencias de ADN adecuadas que codifican la cadena ligera (variable y constante) de 1519 se proporcionan en la SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 91.

40

Ejemplos de secuencias de ADN adecuadas que codifican la cadena pesada (variable y constante, dependiendo del formato) de 1519 se proporcionan en las SEQ ID NO: 37, 38 y 76 (Fab'), SEQ ID NO: 72 u 85 (IgG1), SEQ ID NO: 44 o 93 (IgG4P) y SEQ ID NO: 88 (IgG4).

Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de un fragmento Fab' de anticuerpo de la presente invención que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 37. También se proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de un fragmento Fab' de anticuerpo de la presente invención que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 23.

45

En un ejemplo, la presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo IgG4(P) de la presente invención en la que el ADN que codifica la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 44 o la SEQ ID NO: 93 y el ADN que codifica la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 75 o la SEQ ID NO: 91.

50

En un ejemplo, la presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo Fab-dsFv de la presente invención en la que el ADN que codifica la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 51 o la SEQ ID NO: 80 y el ADN que codifica la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 79.

55

La presente invención también se refiere a un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente, y las secuencias señal adecuadas. En un ejemplo, el vector comprende una secuencia intergénica entre las cadenas pesada y ligera (véase el documento WO03/048208).

60

65

Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Manual Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Se puede usar cualquier sistema de vector/célula hospedadora adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos o también se pueden usar sistemas de expresión de células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, mamíferos. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o de hibridoma.

Los tipos adecuados de células de ovario de hámster chino (células CHO) para su uso en la presente invención pueden incluir células CHO y CHO-K1 que incluyen células dhfr-CHO, tales como células CHO-DG44 y células CHO-DXB11 y que se pueden usar con un marcador seleccionable DHFR o células CHOK1-SV que se pueden usar con un marcador seleccionable de glutamina sintetasa. Otros tipos de células de uso en la expresión de anticuerpos incluyen líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NSO y células SP2, células COS.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteínas a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo se necesita usar una secuencia que codifica el polipéptido de cadena pesada o cadena ligera para transfectar las células hospedadoras. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa, se puede usar un solo vector, el vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente divulgación se expresan a buenos niveles de las células hospedadoras. Por lo tanto, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos son propicias para el procesamiento comercial.

Por lo tanto, se proporciona un proceso para cultivar una célula hospedadora y expresar un anticuerpo o fragmento del mismo, aislar esta última y, opcionalmente, purificarla para proporcionar un anticuerpo o fragmento aislado. En una realización, el proceso comprende además la etapa de conjugar una molécula efectora con el anticuerpo o fragmento aislado, por ejemplo, conjugar con un polímero de PEG en particular como se describe en el presente documento.

Se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la divulgación) que comprende las etapas: realizar una cromatografía de intercambio aniónico en modo no vinculante, de modo que las impurezas se conserven en la columna y se eluya el anticuerpo.

En un aspecto de la divulgación, la purificación emplea captura por afinidad en una columna FcRn.

En un aspecto de la divulgación, la purificación emplea azul de cibacrón o similar para la purificación de moléculas de fusión o conjugado de albúmina.

Las resinas de intercambio iónico adecuadas para su uso en el proceso incluyen la resina Q.FF (suministrada por GE-Healthcare). La etapa puede, por ejemplo, realizarse a un pH de aproximadamente 8.

El proceso puede comprender además una etapa de captura inicial que emplea cromatografía de intercambio catiónico, realizada, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4 a 5, tal como 4,5. La cromatografía de intercambio catiónico puede, por ejemplo, emplear una resina tal como la resina CaptoS o SP sefarosa FF (suministrada por GE-Healthcare). El anticuerpo o fragmento se puede entonces eluir de la resina empleando una solución de sal iónica tal como cloruro de sodio, por ejemplo, a una concentración de 200 mM.

Por lo tanto, la etapa o etapas del cromatógrafo pueden incluir una o más etapas de lavado, según sea adecuado.

El proceso de purificación también puede comprender una o más etapas de filtración, tal como una etapa de diafiltración.

Por lo tanto, en una realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento anti-FcRn purificado, por ejemplo, un

anticuerpo o fragmento humanizado, en particular, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, sustancialmente purificado, en particular, libre o sustancialmente libre de endotoxinas y/o proteína o ADN de la célula hospedadora.

- 5 La forma purificada, tal como se utiliza *supra*, pretende referirse a una pureza de al menos el 90 %, tal como el 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % p/p o más puro.

Sustancialmente libre de endotoxinas se refiere, en general, a un contenido de endotoxinas de 1 UE por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 0,5 o 0,1 UE por mg de producto.

- 10 En general, se considera que la proteína o el ADN de la célula hospedadora está sustancialmente libre se refiere al contenido de ADN y/o proteínas de la célula hospedadora de 400 µg por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100 µg por mg o menos, en particular, 20 µg por mg, según sea adecuado.

- 15 La molécula de anticuerpo de la presente invención también puede usarse en el diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico *in vivo* y en la obtención de imágenes de estados de enfermedad que implican FcRn.

- 20 Como los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de una molécula de anticuerpo de la divulgación para la fabricación de un medicamento. La composición generalmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 25 La presente divulgación también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 30 La molécula de anticuerpo puede ser el único principio activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede ir acompañada de otros principios activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos o ingredientes que no son anticuerpos tales como los esteroides u otras moléculas de fármacos, en particular moléculas de fármacos cuya semivida es independiente de la unión de FcRn.

- 35 Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o evitar una enfermedad o afección diana, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, generalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Dicha información se puede usar luego para determinar las dosis útiles y las vías de administración en seres humanos.

- 45 La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación de fármacos, las sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante la experimentación de rutina y está dentro del criterio del clínico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como 100 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

- 50 Las dosis terapéuticas de los anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación no muestran efectos toxicológicos aparentes *in vivo*.

- 55 En una realización de un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, una dosis única puede proporcionar hasta un 70 % de reducción en los niveles circulantes de IgG.

- 60 La reducción terapéutica máxima en IgG circulante se puede observar aproximadamente 1 semana después de la administración de la dosis terapéutica en cuestión. Los niveles de IgG pueden recuperarse durante un período de aproximadamente seis semanas si no se administran dosis terapéuticas adicionales.

- 65 De forma ventajosa, los niveles de IgG *in vivo* pueden mantenerse a un nivel apropiadamente bajo mediante la administración de dosis secuenciales del anticuerpo o fragmentos de acuerdo con la divulgación.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por

ejemplo, de manera simultánea, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente divulgación se emplean con una terapia inmunosupresora, tal como un esteroide, en particular prednisona.

5 En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente divulgación se emplean con Rituximab u otras terapias de linfocitos B.

10 En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente divulgación se emplean con cualquier agente modulador de linfocitos B o linfocitos T o inmunomodulador. Los ejemplos incluyen metotrexato, micofenolato y azatioprina.

15 La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, el grado de inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está utilizando de forma profiláctica o para tratar una afección existente.

20 La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis por día. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene un perfil de semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días) y/o de farmacodinámica (PD, de sus siglas en inglés) de larga duración, solo puede ser necesario administrar una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

En una realización, la dosis se administra bisemanalmente, es decir, dos veces al mes.

25 La semivida, como se emplea en el presente documento, pretende referirse a la duración de la molécula en circulación, por ejemplo, en suero/plasma.

30 La farmacodinámica, como se emplea en el presente documento, se refiere al perfil y, en particular, a la duración de la acción biológica de la molécula de acuerdo con la presente divulgación.

35 El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes y de metabolismo lento, tales como las proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

40 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, en tales composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas y suspensiones, para la ingestión por parte del paciente.

45 Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstituirse antes de usarla con un líquido estéril apropiado.

50 Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones están adaptadas para la administración a sujetos humanos.

55 Adecuadamente, en las formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, si el pI de la proteína está en el intervalo de 8-9 o superior, entonces una formulación de pH de 7 puede ser apropiada. Si bien no deseamos estar limitados por la teoría, se piensa que esto puede proporcionar finalmente una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

60 En un ejemplo, la formulación farmacéutica a un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 comprende: de 1 a 200 mg/ml de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, de 1 a 100 mM de un tampón, del 0,001 al 1 % de un tensioactivo, a) de 10 a 500 mM de un estabilizador, b) de 10 a 500 mM de un estabilizador y de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad, o c) de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad.

- Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante cualquier número de rutas que incluyen, pero sin limitación, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hiposprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Normalmente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.
- El suministro directo de las composiciones generalmente se llevará a cabo mediante inyección, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.
- Se apreciará que el principio activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una vía que utiliza el tracto gastrointestinal, la composición deberá contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido del tracto gastrointestinal.
- Una discusión exhaustiva de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).
- En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas que incluye inhalación.
- Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la divulgación que contiene la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con excipiente fisiológicamente aceptable.
- Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se usan adecuadamente mono o disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, particularmente, pero no exclusivamente, en forma de sus hidratos.
- Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micrómetros, tal como de 1 a 9 micrómetros, por ejemplo, de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del principio activo (como el anticuerpo o fragmento) es de primordial importancia.
- Los gases propulsores que se pueden usar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente se pueden usar solos o en mezclas de los mismos.
- Los gases propulsores particularmente adecuados son los derivados de alcano halogenados seleccionados de entre TG11, TG12, TG134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y sus mezclas son particularmente adecuados.
- Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor también pueden contener otros ingredientes como cosolventes, estabilizantes, agentes tensioactivos (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.
- Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor de acuerdo con la divulgación pueden contener hasta un 5 % en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la divulgación contienen, por ejemplo, del 0,002 al 5 % en peso, del 0,01 al 3 % en peso, del 0,015 al 2 % en peso, del 0,1 al 2 % en peso, del 0,5 al 2 % en peso o del 0,5 al 1 % en peso de principio activo.
- Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante la administración de una solución líquida o una formulación en suspensión, por ejemplo, empleando un dispositivo como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).
- El anticuerpo de la invención se puede administrar disperso en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica adecuada, por ejemplo, solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la

técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para alcanzar un pH de aproximadamente de 4,0 a 5,0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, un anticuerpo liofilizado.

5 Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o
10 suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generalmente se proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y la esterilización mediante filtración del disolvente/solución tamponada utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución del disolvente tamponado estéril y la
15 administración de la formulación en recipientes estériles mediante métodos familiares para los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación puede proporcionarse, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) envasados en sobres de papel de
20 aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de disolvente/solución tamponada.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden ser adecuados para el suministro mediante nebulización.

25 También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se pueda administrar mediante el uso de terapia génica. Con el fin de lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente de tal manera que las cadenas de anticuerpo se expresan a partir de las secuencias de ADN y se ensamblan *in situ*.

30 La presente divulgación también proporciona una molécula de anticuerpo (o composiciones que la comprenden) para su uso en el control de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, encefalomiелitis aguda diseminada (ADEM), leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, vasculitis asociada a ANCA, espondilitis anquilosante, nefritis anti-GBM/anti-TBM, síndrome antifosfolípido (APS), angioedema autoinmunitaria, anemia aplásica autoinmunitaria, disautonomía autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído
35 interno autoinmunitaria (AIED), miocarditis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, neuropatías axonales y nales, enfermedad de balo, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), ostiomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), síndrome de Churg-Strauss, pénfigo cicatricial/pénfigo mucosal benigno, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogan, enfermedad de las aglutininas frías, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis coxsackie, enfermedad de CREST, crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), cardiomiopatía dilatada, lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, fibrosis angiocéntrica eosinófila,
45 fascitis eosinófila, eritema nudoso, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Evans, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulomatosis con poliangitis (GPA) véase Wegener's, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, Encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, nefritis tubulointestinal hipocomplementémica idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, enfermedad relacionada con IgG4, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, lipoproteínas inmunorreguladoras, aneurisma aórtico inflamatorio, pseudotumor inflamatorio, miositis por cuerpos de inclusión, diabetes dependiente de insulina (tipo I), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, tumor de Kuttner, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad por IgA lineal (LAD), lupus (SLE), enfermedad de Lyme, crónica, fibrosis del mediastino, enfermedad de Meniere, poliangeítis microscópica, síndrome de Mikulicz, enfermedad del tejido conectivo mixto (MCTD), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, fibroesclerosis multifocal, escleroso múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, enfermedad de Ormond (fibrosis retroperitoneal), reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunitarios asociados con Streptococcus), degeneración cerebelosa paraneoplásica, polineuropatías paraproteinémicas, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, Pars planitis (uveítis periférica), pénfigo vulgar, periaortitis, periartritis, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarios tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome de infarto post-miocardio, síndrome postpericardiotomía, dermatitis de progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenoso, aplasia pura de glóbulos rojos, fenómeno de Raynaud, distrofia simpática refleja, síndrome de Reiter, policondritis

- recurrente, síndrome de las piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal (enfermedad de Ormond), fiebre reumática, artritis reumatoide, tiroiditis de Riedel, sarcoidosis, Síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, autoinmunidad testicular y de esperma, síndrome del hombre rígido, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, oftalmía simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo (UCTD), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculobullosa, vitíligo, macroglobulinemia de Waldenström, anemia hemolítica idiopática cálida y granulomatosis de Wegener (ahora denominada granulomatosis con poliangiitis (GPA)).
- 10 En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la divulgación se emplean en el tratamiento o profilaxis de epilepsia o convulsiones.
- En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la divulgación se emplean en el tratamiento o profilaxis de esclerosis múltiple.
- 15 En la realización, los anticuerpos y fragmentos de la divulgación se emplean en enfermedades/indicaciones aloinmunitarias que incluyen:
- Desapareamiento del donante de trasplante debido a los anticuerpos anti-HLA
 - Trombocitopenia aloinmunitaria fetal y neonatal, FNAIT (o trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, NAITP o NAIT o NAT, o trombocitopenia aloinmunitaria feto-materna, FMAITP o FMAIT).
- 20 Las indicaciones adicionales incluyen: eliminación rápida de fármacos biofarmacéuticos que contienen Fc de pacientes humanos y combinación de terapia anti-FcRn con otras terapias - IVIg, Rituxan, plasmaféresis. Por ejemplo, la terapia anti-FcRn puede emplearse después de la terapia con Rituxan.
- 25 En una realización, los anticuerpos y fragmentos de la divulgación se emplean en un trastorno neurológico tal como:
- polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP)
 - síndrome de Guillain-Barre
 - polineuropatías paraproteinémicas
 - neuromielitis óptica (NMO, trastornos del espectro NMO o enfermedades del espectro NMO), y
 - miastenia grave.
- 30
- 35 En una realización, los anticuerpos y fragmentos de la divulgación se emplean en un trastorno dermatológico tal como:
- penfigoide ampolloso
 - pénfigo vulgar
 - vasculitis asociada a ANCA
 - cardiomiopatía dilatada
- 40
- En una realización, los anticuerpos y fragmentos de la divulgación se emplean en un trastorno hematológico de inmunología tal como:
- 45
- púrpura trombocitopénica idiopática (ITP)
 - púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)
 - anemia hemolítica idiopática cálida
 - síndrome de Goodpasture
 - desapareamiento del donante de trasplante debido a los anticuerpos anti-HLA
- 50
- En una realización, el trastorno se selecciona de miastenia grave, neuromielitis óptica, CIDP, síndrome de Guillain-Barre, Polineuropatía para-proteinémica, epilepsia refractaria, ITP/TTP, anemia hemolítica, síndrome de Goodpasture, desapareamiento ABO, nefritis por lupus, vasculitis renal, esclerodermia, alveolitis fibrosante, miocardiopatía dilatada, enfermedad de Grave, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria, Pénfigo, esclerodermia, Lupus, vasculitis asociadas con anticuerpos ANCA, dermato-miositis, enfermedad de Sjogren y artritis reumatoide.
- 55
- En una realización, el trastorno se selecciona de síndrome poliendocrino autoinmunitario de tipo 1 (APECED o síndrome de Whitaker) y 2 (síndrome de Schmidt); alopecia universalis; crisis miasténica; crisis tiroidea; enfermedad ocular asociada a la tiroides; oftalmopatía tiroidea; diabetes autoinmunitaria; autoanticuerpos asociados con encefalitis y/o encefalopatía; pénfigo filiar; epidermolisis ampollosa; dermatitis herpetiforme; corea de Sydenham; neuropatía axonal motora aguda (AMAN); síndrome de Miller-Fisher; neuropatía motora multifocal (MMN); opsoclonos; miopatía inflamatoria; síndrome de Isaac (neuromiotonía autoinmunitaria), síndromes paraneoplásicos y encefalitis límbica.
- 60
- 65

Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente divulgación pueden emplearse en tratamiento o profilaxis.

La presente divulgación también proporciona un método para reducir la concentración de anticuerpos no deseados en un individuo que comprende las etapas de administrar a un individuo una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión del mismo descrito en el presente documento.

La presente divulgación comprende el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos como reactivo para diagnóstico, por ejemplo, conjugado con una molécula informadora. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la divulgación que está marcado. Se proporciona una columna que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la divulgación.

Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo anti-FcRn o un fragmento de unión para su uso como reactivo para usos tales como:

- 1) purificación de la proteína FcRn (o fragmentos de la misma) - se conjuga con una matriz y se usa como una columna de afinidad, o (como una forma modificada de anti-FcRn) como agente precipitante (por ejemplo, como una forma modificada con un dominio reconocido por otra molécula, que puede modificarse mediante la adición de un Fc (o producirse como IgG de longitud completa), que se precipita opcionalmente mediante un reactivo anti-Fc)
- 2) detección y/o cuantificación de FcRn sobre células o en células, vivas o fijas (células *in vitro* o en tejidos o secciones celulares). Los usos para esto pueden incluir la cuantificación de FcRn como biomarcador, para seguir el efecto del tratamiento anti-FcRn. Para estos fines, el candidato podría usarse en una forma modificada (por ejemplo, mediante la adición de un dominio Fc, como en la IgG de longitud completa, o alguna otra fracción, como una proteína de fusión genética o conjugado químico, tal como la adición de un marcador fluorescente utilizado para fines de detección).
- 3) purificación o clasificación de las células portadoras de FcRn marcadas mediante la unión al candidato modificado de maneras ejemplificadas en (1) y (2).

La presente divulgación también proporciona un ensayo adecuado para evaluar la capacidad de una molécula de prueba, tal como una molécula de anticuerpo, para inhibir la actividad de FcRn y, en particular, la capacidad de las células para reciclar IgG. Dicho ensayo puede ser útil para identificar inhibidores de la actividad de FcRn, tales como moléculas de anticuerpo o moléculas pequeñas y, como tal, también puede ser útil como un ensayo de liberación discontinua en la producción de dicho inhibidor.

En un aspecto, se proporciona un ensayo adecuado para evaluar la capacidad de una molécula de prueba, tal como una molécula de anticuerpo, para inhibir la actividad de FcRn humano y, en particular, la capacidad de FcRn humano para reciclar IgG, en el que el método comprende las etapas de:

- a) revestir una superficie de células de mamíferos no humanos que expresan de forma recombinante la cadena alfa de FcRn humano y la microglobulina $\beta 2$ humana ($\beta 2M$),
- b) poner en contacto las células en condiciones levemente ácidas, tal como aproximadamente pH 5,9, con una molécula de prueba y una IgG para ser reciclada por la célula durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión de la molécula de prueba y la IgG a FcRn, agregando opcionalmente la molécula de prueba antes de que la IgG sea reciclada e incubar durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión de la molécula de prueba a FcRn.
- c) lavar con un tampón ligeramente ácido, y
- d) detectar la cantidad de IgG internalizada y/o reciclada por las células.

En un aspecto, se proporciona un ensayo adecuado para evaluar la capacidad de una molécula de prueba, tal como una molécula de anticuerpo, para inhibir la actividad de FcRn humano y, en particular, la capacidad de FcRn humano para reciclar IgG, en el que el método comprende las etapas de:

- a) revestir una superficie de células de mamíferos no humanos que expresan de forma recombinante la cadena alfa de FcRn humano y la microglobulina $\beta 2$ humana ($\beta 2M$),
- b) poner en contacto las células en condiciones levemente ácidas, tal como aproximadamente pH 5,9, con una molécula de anticuerpo de prueba y una IgG para ser reciclada por la célula durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión de la molécula de anticuerpo de prueba y la IgG a FcRn, agregando opcionalmente la molécula de anticuerpo de prueba antes de que la IgG sea reciclada e incubar durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión de la molécula de anticuerpo de prueba a FcRn.
- c) lavar con un tampón ligeramente ácido para eliminar la IgG no unida y la molécula de anticuerpo de prueba, y
- d) detectar la cantidad de IgG reciclada por las células.

En un aspecto, se proporciona un ensayo adecuado para evaluar la capacidad de una molécula de prueba, tal como una molécula de anticuerpo, para inhibir la actividad de FcRn humano y, en particular, la capacidad de FcRn humano para reciclar IgG, en el que el método comprende las etapas de:

- a) revestir una superficie de células de mamíferos no humanos que expresan de forma recombinante la cadena alfa de FcRn humano y la microglobulina $\beta 2$ humana ($\beta 2M$),
- b) poner en contacto las células en condiciones levemente ácidas, tal como aproximadamente pH 5,9, con una molécula de anticuerpo de prueba y una IgG para ser reciclada por la célula durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión de la molécula de anticuerpo de prueba y la IgG a FcRn, agregando opcionalmente la molécula de anticuerpo de prueba antes de que la IgG sea reciclada e incubar durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión de la molécula de anticuerpo de prueba a FcRn.
- c) lavar con un tampón ligeramente ácido para eliminar la IgG no unida y la molécula de anticuerpo de prueba,
- d) incubar las células en un tampón neutro, tal como aproximadamente pH 7,2
- e) detectar la cantidad de IgG reciclada por las células mediante la determinación de la cantidad de IgG liberada en el sobrenadante.

Las células adecuadas incluyen células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) II. La transfección de células MDCKII con cadena alfa de FcRn humano y $\beta 2$ microglobulina humana ($\beta 2M$) ha sido descrita previamente por Claypool et al., 2002, Journal of Biological Chemistry, 277, 31, 28038-28050. Este documento también describe el reciclado de IgG mediante estas células transfectadas.

Los medios para soportar las células durante las pruebas incluyen medios completos que comprenden MEM (Gibco n.º 21090-022), 1 x aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035), 1 x piruvato de sodio (Gibco n.º 11360-039) y L-glutamina (Gibco n.º 25030-024).

Se puede preparar un lavado ácido tomando HBSS+ (PAA n.º H15-008) y añadiendo MES 1 M hasta que se alcance un pH de 5,9 +/- 0,5. También se puede añadir BSA alrededor del 1 % (Sigma n.º A9647).

Se puede preparar un lavado neutro tomando HBSS+ (PAA n.º H15-008) y añadiendo Hepes 10 M hasta alcanzar un pH 7,2 +/- 0,5. También se puede añadir BSA alrededor del 1 % (Sigma n.º A9647).

El lavado de las células con tampón ácido elimina el anticuerpo de prueba no unido y la IgG no unida y permite que se realicen análisis adicionales. Las condiciones ácidas utilizadas en la etapa (b) fomentan la unión de la IgG a FcRn y la internalización y el reciclado de la misma.

La cantidad de anticuerpo de prueba o fragmento e IgG solo en la superficie de las células puede determinarse mediante el lavado de las células con lavado neutro y el análisis del sobrenadante/lavados para detectar la cantidad de anticuerpo de prueba o IgG. Es importante destacar que no se emplea un tampón de lisis. Para determinar la cantidad de IgG internalizada por las células, el anticuerpo se puede eliminar primero de la superficie de la célula con un lavado neutro y las células se lisan con un tampón de lisis y luego se analizan los contenidos internos. Para determinar la cantidad de IgG reciclada por las células, las células se incuban en condiciones neutras durante un período de tiempo adecuado y el tampón circundante se analiza para determinar el contenido de IgG. Si se requiere la superficie y el contenido de anticuerpos internos de la célula, entonces la célula se puede lavar con lavado ácido para mantener la presencia del anticuerpo en la superficie celular, seguido de la lisis celular y el análisis del material combinado.

Cuando se desea medir tanto la internalización como el reciclado de las muestras de IgG, se ejecutan por duplicado y las pruebas de internalización y reciclado se realizan por separado.

Un tampón de lisis adecuado incluye NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton-X 100 al 1 %, por cada 10 ml de inhibidores de la proteasa/inhibidores de fosfato añadidos como se describe en las pautas del fabricante.

Normalmente, la IgG que se va a reciclar está marcada, en un ejemplo, se puede usar una IgG humana biotinilada. Luego se puede detectar la IgG empleando, por ejemplo, 25 ml de anticuerpo de detección de estreptavidina marcado con azufre (como MSD n.º r32ad-5) a 0,2 μ g/ml de tampón de inhibición de MSD. El tampón de inhibición puede comprender Tris 500 mM, pH 7,5. NaCl 1,5 M y Tween-20 al 0,2 % y BSA al 1,5 %.

Alternativamente, la IgG se puede marcar previamente con un fluoróforo o un marcador similar.

En un aspecto de la divulgación, una superficie adecuada es una placa o pocillo de plástico, tal como una placa de 96 pocillos o similar, un portaobjetos de vidrio o una membrana. En un ejemplo, las células se recubren sobre la superficie a una densidad que da como resultado la formación de una monocapa.

En un aspecto de la divulgación, el ensayo descrito en el presente documento no es una medida de la transcitosis de un anticuerpo de arriba a abajo a través de una membrana con un gradiente de pH en la misma, por ejemplo, condiciones ácidas en un lado de la membrana y condiciones neutras en la parte inferior de la membrana.

En un ejemplo, el anticuerpo de prueba o fragmento y la IgG se pueden incubar con las células en la etapa (b) durante aproximadamente 1 hora, por ejemplo, a temperatura ambiente en condiciones ácidas para permitir la unión.

En un ejemplo, el anticuerpo de prueba o fragmento se pueden incubar con las células en la etapa (b) durante aproximadamente 1 hora, por ejemplo, a temperatura ambiente en condiciones ácidas para permitir la unión antes de la adición de la IgG a reciclar. Posteriormente, la IgG a reciclar por la célula puede incubarse con las células en la etapa (b) durante aproximadamente 1 hora, por ejemplo, a temperatura ambiente en condiciones ácidas para permitir la unión.

Las condiciones neutras facilitan la liberación de IgG en el sobrenadante.

10 Comprender en el contexto de la presente especificación tiene el propósito de incluir el significado.

Donde técnicamente se pueden combinar realizaciones apropiadas de la invención.

15 Las realizaciones se describen en el presente documento como que comprenden ciertas características/elementos. La divulgación también se extiende a realizaciones separadas que consisten o consisten esencialmente en dichas características/elementos.

La presente invención se describe adicionalmente a modo de ilustración solamente en los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras adjuntas, en los que:

- 20 La **Figura 1** muestra ciertas secuencias de aminoácidos y polinucleótidos.
 La **Figura 2** muestra alineaciones de ciertas secuencias.
 La **Figura 3** muestra una comparación de la unión en MDCK II humana para un fragmento Fab' de acuerdo con la presente divulgación y una versión PEGilada del mismo
 25 La **Figura 4** muestra un fragmento Fab' de acuerdo con la presente divulgación y una versión PEGilada del mismo que inhibe el reciclado de IgG en células MDCK II
 La **Figura 5** muestra un fragmento Fab' PEGilado de acuerdo con la presente divulgación que inhibe la transcitosis de IgG de origen apical a basolateral en células MDCK II
 La **Figura 6** muestra una comparación de la unión de MDCK II de macaco para un fragmento Fab' de acuerdo con la presente divulgación y una versión PEGilada del mismo
 30 La **Figura 7** muestra un fragmento Fab' PEGilado de acuerdo con la presente divulgación que inhibe el reciclado de IgG en células MDCK II para versiones de seres humanos y macacos de las mismas
 La **Figura 8** muestra el efecto de una dosis única de una molécula Fab' PEGilada de acuerdo con la divulgación sobre los niveles de IgG en plasma en macacos
 35 La **Figura 9** muestra el efecto de cuatro dosis semanales de una molécula Fab' PEGilada de acuerdo con la divulgación sobre los niveles de IgG en plasma
 La **Figura 10** muestra una representación esquemática de la función de reciclado de anticuerpos de FcRn inhibida mediante una proteína de inhibición
 La **Figura 11** muestra el análisis de inhibición de IgG humana basada en citometría de flujo utilizando anticuerpos IgG gamma 1 purificados
 40 La **Figura 12** muestra las dosis IV de Fab'PEG únicas/intermitentes en la farmacodinámica de IgG normal en macacos de 20 mg/kg los días 1 y 67
 La **Figura 13** muestra las dosis IV de Fab'PEG:repetidas en la farmacodinámica de IgG normal en macacos de 4 x 20 o 100 mg/kg por semana
 45 La **Figura 14** muestra las dosis IV de Fab'PEG únicas/intermitentes en la farmacodinámica de IgG normal en macacos a -20 mg/kg y 100 mg/kg los días 1 y 67
 La **Figura 15** muestra los niveles de IgG en plasma en 4 macacos después de 2 dosis IV de 20 mg/kg de Fab'PEG de 1519.g57
 50 La **Figura 16** muestra los niveles de IgG en plasma en 4 macacos que reciben 10 dosis IV de 20 mg/kg de Fab'PEG de 1519.g57, una cada 3 días
 La **Figura 17** muestra el efecto de dos dosis IV de 30 mg/kg de IgG4P de 1519.g57 sobre la IgG en plasma endógena en macacos
 La **Figura 18** muestra el efecto de 30 mg/kg si van seguidas de 41 dosis diarias de 5 mg/kg de IgG4P de 1519.g57 en IgG en plasma en macacos
 55 La **Figura 19** muestra el resultado de la dosificación diaria con vehículo en la IgG plasmática en macacos
 La **Figura 20** muestra el aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con Fab'PEG de CA170_01519.g57 o PBS IV
 La **Figura 21** muestra el aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con IgG1 o IgG4 de CA170_01519.g57 o PBS IV
 60 La **Figura 22** muestra el aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con Fab'- albúmina de suero humano de CA170_01519.g57 o PBS IV
 La **Figura 23** muestra el aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con FabFv de CA170_01519.g57 o PBS IV
 La **Figura 24** muestra el aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con Fab o Fab'PEG de CA170_01519.g57 o PBS IV
 65 La **Figura 25** muestra una proteína de fusión de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, denominada

Fab-dsFv.

Ejemplos

- 5 Las siguientes inmunizaciones se realizaron para generar material para el cultivo de linfocitos B y la detección de anticuerpos:
las ratas Sprague Dawley se inmunizaron con tres dosis de fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan conjuntamente FcRn humano mutante (L320A; L321A) (Ober et al., 2001 Int. Immunol. 13, 1551-1559) y β 2M de ratón con un cuarto refuerzo final del dominio extracelular de FcRn humano.
- 10 Los sueros se monitorizaron tanto para la unión a FcRn mutante en células HEK-293 como para su capacidad para evitar la unión de IgG humana marcada con Alexafluor 488. Ambos métodos se realizaron por citometría de flujo. Para la unión, se utilizaron reactivos secundarios específicos anti-Fc de ratón o rata marcados con ficoeritrina (PE) para revelar la unión de IgG en los sueros.
- 15 Los cultivos de linfocitos B se prepararon utilizando un método similar al descrito por Zubler *et al.* (1985). En resumen, se cultivaron linfocitos B a una densidad de aproximadamente 5000 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos con código de barras con 200 μ l/pocillo de medio RPMI 1640 (Gibco BRL) complementado con FCS al 10 % (PAA laboratories ltd), HEPES al 2 % (Sigma Aldrich), L-Glutamina al 1 % (Gibco BRL), solución de penicilina/estreptomycin al 1 % (Gibco BRL), β -mercaptoetanol al 0,1 % (Gibco BRL), sobrenadante de cultivo de esplenocitos de conejo activado al 2-5 % y células de timoma murino EL-4-B5 irradiadas con radiación gamma (5x10⁴/pocillo) durante siete días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.
- 20 La presencia de anticuerpos específicos de FcRn en sobrenadantes de cultivos de linfocitos B se determinó utilizando un ensayo de unión homogéneo basado en fluorescencia utilizando células HEK-293 transfectadas transitoriamente con FcRn mutante (estabilizado en la superficie) como fuente de antígeno diana. Se transfirieron 10 μ l de sobrenadante de placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con código de barras a placas de ensayo de pared negra de 384 pocillos con código de barras que contenían 5000 células HEK-293 transfectadas por pocillo utilizando un manipulador de líquidos Matrix Platemate. La unión se reveló con un conjugado de cabra Cy-5 específico para Fc γ anti-IgG de rata o ratón (Jackson). Las placas se leyeron en un sistema de detección celular Applied Biosystems 8200. De las placas de cultivo de 3800 x 96 pocillos, que representan 38 animales inmunizados diferentes, se identificaron 9800 aglutinantes anti-FcRn humano. Se estimó que esto representaba la detección de aproximadamente 2,5 billones de linfocitos B.
- 25 Después de la selección primaria, los sobrenadantes positivos se consolidaron en placas maestras con código de barras de 96 pocillos utilizando un robot de recolección de golpes Aviso Onyx y los linfocitos B en placas de cultivo celular congeladas a -80 °C. Las placas maestras se seleccionaron luego en un ensayo de Biacore para identificar los pocillos que contienen anticuerpos de alta afinidad y aquellos que inhibían la unión de la IgG humana a FcRn (véase más abajo).
- 30 El análisis de interacción biomolecular utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizó en un sistema BIAcore T200 (GE Healthcare). Se inmovilizó gamma Fc de cabra anti-IgG de rata (Chemicon International Inc.) en NaAc 10 mM, tampón de pH 5 en un chip de sensor CM5 mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de captura de aprox. 19500 unidades de respuesta (UR) que utilizan HBS-EP+ como tampón en ejecución. Se utilizó fosfato 50 mM, pH 6 + NaCl 150 mM como tampón de ejecución para el ensayo de afinidad e inhibición. Los sobrenadantes del cultivo de linfocitos B se diluyeron 1 en 5 en fosfato 200 mM, pH 6 + NaCl 150 mM. Se usó una inyección de 600 s de sobrenadante de linfocitos B diluidos a 5 μ l/min para la captura mediante la anti-IgG inmovilizada de rata, Fc. Se inyectó FcRn humano a 100 nM sobre el sobrenadante del cultivo de linfocitos B capturado durante 180 s a 30 μ l/min seguido de una disociación de 360 s. Se inyectó IgG humana (Jackson ImmunoResearch) durante 60 s con 180 s de disociación a 30 μ l/min.
- 35 Los datos se analizaron utilizando el software de evaluación T200 (versión 1.0) para determinar las constantes de afinidad (K_D) de los anticuerpos y determinar aquellos que inhiben la unión de IgG.
- 40 Como un ensayo alternativo, los sobrenadantes de la placa maestra también se examinaron en un ensayo de inhibición de IgG humana basado en células. Se añadieron 25 μ l de sobrenadante de cultivo de linfocitos B de placas maestras a una placa de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U. Luego se añadieron células HEK-293 transfectadas con hFcRn mutantes (50.000 células por pocillo en 25 μ l de PBS pH 6/FCS al 1 %) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 150 μ l de medio PBS. Las células se resuspendieron luego en 50 μ l/pocillo de medio PBS/FCS que contenía IgG humana marcada con Alexafluor 488 o 649 a 7,5 μ g/ml y se incubaron 1 hora a 4 °C. Las células luego se lavaron dos veces con 150 μ l de medio y luego se resuspendieron en 35 μ l/pocillo de medio PBS/FCS que contenía formaldehído al 1 % como fijador. Las placas se leyeron luego en un citómetro de flujo FACS Canto 2. Ejemplo de datos se da en la Figura 11.
- 45 Para permitir la recuperación de los genes de la región variable del anticuerpo de una selección de pocillos de interés, se tuvo que realizar un paso de desconvolución para permitir la identificación de los linfocitos B específicos de antígeno en un pocillo dado que contenía una población heterogénea de linfocitos B. Esto se logró utilizando el
- 50
- 55
- 60
- 65

método de los focos fluorescentes. En resumen, los linfocitos B secretores de inmunoglobulinas de un pocillo positivo se mezclaron con perlas de estreptavidina (New England Biolabs) recubiertas con FcRn humano biotinilado y una dilución final de 1:1200 de un conjugado de cabra FITC específico de fragmento anti-Fc γ de rata o ratón (Jackson). Después de la incubación estática a 37 °C durante 1 hora, se pudieron identificar linfocitos B específicos de antígeno debido a la presencia de un halo fluorescente que rodea ese linfocito B. Estos linfocitos B individuales, identificados mediante un microscopio Olympus, se seleccionaron luego con un micromanipulador Eppendorf y se depositaron en un tubo de PCR. Se generaron focos fluorescentes a partir de 268 pocillos seleccionados.

Los genes de la región variable del anticuerpo se recuperaron de células individuales mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT)-PCR utilizando cebadores específicos de región variable de cadena pesada y ligera. Se realizaron dos rondas de PCR en un robot de manejo de líquido Aviso Onyx, con la 2ª PCR anidada que incorpora sitios de restricción en los extremos 3' y 5' permitiendo la clonación de las regiones variables en un vector de expresión de mamíferos Kappa (VL) de ratón o IgG γ 1 (VH) de ratón. Las construcciones de cadena pesada y ligera emparejadas se cotransfectaron en células HEK-293 utilizando Fectin 293 (Invitrogen) y se cultivaron en placas de 48 pocillos en un volumen de 1 ml. Después de 5-7 días de expresión, los sobrenadantes se recogieron y el anticuerpo se sometió a un examen adicional.

La PCR recuperó con éxito pares cognados de cadena ligera y pesada de linfocitos B individuales de 156 de los pocillos seleccionados. El análisis de secuencia de ADN de los genes clonados de la región variable identificó varias familias únicas de anticuerpos recombinantes. Después de la expresión, se interrogaron los sobrenadantes transitorios tanto en la inhibición de FACS de IgG humana (descrito anteriormente) como en los ensayos de reciclado de IgG. En algunos casos, se produjo y probó IgG γ 1 de ratón purificada (los datos se marcaron en consecuencia).

El ensayo de reciclado usó células MDCK II (clon 34 como se describe en los Ejemplos 4 y 5 a continuación) que expresan en exceso FcRn humano y beta 2 microglobulina en placas a 25.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos. Estas se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se lavaron con HBSS+ Ca/Mg pH 7,2 + BSA al 1 % y luego se incubaron con 50 μ l de concentraciones variables de sobrenadante transitorio HEK-293 o anticuerpo purificado durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 ng/ml de IgG humana biotinilada (Jackson) en 50 μ l de HBSS+ Ca/Mg pH 5,9 + BSA al 1 % a las células y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 %. Luego, las células se lavaron tres veces en HBSS+ Ca/Mg pH 5,9 y se añadieron a las células 100 μ l de HBSS+ Ca/Mg pH 7,2 y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 2 horas. El sobrenadante se eliminó de las células y se analizó para determinar la IgG total utilizando un ensayo MSD con un anticuerpo de captura anti-IgG humana (Jackson) y un anticuerpo revelador de marcador de estreptavidina-sulfo (MSD). La curva de inhibición se analizó mediante regresión no lineal para determinar los valores de CI₅₀.

Basándose en el rendimiento en estos ensayos, se seleccionó una familia de anticuerpos que comprende las seis CDR dadas en las SEQ ID NO 1 a 6. El anticuerpo CA170_01519 tuvo la mejor actividad y se seleccionó para la humanización.

Ejemplo 1 Método de humanización

El anticuerpo CA170_01519 se humanizó mediante el injerto de las CDR de las regiones V del anticuerpo de rata en los marcos de la región V del anticuerpo de la línea germinal humana. Con el fin de recuperar la actividad del anticuerpo, también se conservaron en la secuencia humanizada una serie de restos marco de las regiones V de rata. Estos restos se seleccionaron utilizando el protocolo descrito por Adair *et al.* (1991) (Humanised antibodies WO91/09967). Las alineaciones de las secuencias de la región V del anticuerpo (donante) de rata con las secuencias de la región V de la línea germinal humana (aceptora) se muestran en las Figuras 2A y 2B, junto con las secuencias humanizadas diseñadas. Las CDR injertadas desde la secuencia donante a la aceptora son las definidas por Kabat (Kabat *et al.*, 1987), con la excepción de CDR-H1 donde se usa la definición combinada de Chothia/Kabat (véase Adair *et al.*, 1991, Humanised antibodies. WO91/09967). La región V humana de VK1 2-1-(1) A30 más la región J de JK2 (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como aceptor para las CDR de cadena ligera. La región V humana de VH3 1-3 3-07 más la región J de JH4 J (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como aceptor para las CDR de cadena pesada.

Los genes que codifican una serie de variantes de las secuencias de la región V de la cadena ligera y pesada se diseñaron y estas se construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizada por Entelechon GmbH. Se crearon variantes adicionales de ambas regiones V de cadena pesada y ligera mediante la modificación de los genes VH y VK mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. Estos genes se clonaron en varios vectores para permitir la expresión de Fab' de 1519 humanizados en células de mamíferos y *E. coli*. Las cadenas variantes, y combinaciones de las mismas, se evaluaron para determinar su expresión en *E. coli*, su potencia en relación con el anticuerpo parental, sus propiedades biofísicas y su aptitud para el procesamiento posterior, lo que llevó a la selección del injerto de cadena ligera gL20 y el injerto de cadena pesada gH20. Las secuencias de injerto gL20 y gH20 seleccionadas finales se muestran en las Figuras 2A y 2B, respectivamente. Este emparejamiento de la región V se denominó 1519.g57.

Los restos del marco de cadena ligera en el injerto gL20 son todos del gen de la línea germinal humana, con la excepción de los restos 36, 37 y 58 (numeración de Kabat), donde se conservan los restos donantes de Leucina (L36), Fenilalanina (F37) e Isoleucina (158), respectivamente. La retención de estos tres restos fue esencial para la potencia total de los Fab' humanizados. Los restos del marco de cadena pesada en el injerto gH20 son todos del gen de la línea germinal humana, con la excepción de los restos 3, 24, 76, 93 y 94 (numeración de Kabat), donde se conservan los restos donantes de Prolina (P3), Valina (V24), Serina (S76), Treonina (T93) y Treonina (T94), respectivamente. La retención de estos cinco restos fue importante para la potencia total de los Fab' humanizados.

Para la expresión en *E. coli*, los genes humanizados de la región V de cadena ligera y pesada se clonaron en el vector de expresión UCT pTTOD, que contiene ADN que codifica la región constante C-kappa humana (alotipo K1m3) y la región bisagra CH1 gamma-1 humana (alotipo G1m17). El gen FkpA de *E. coli* también se introdujo en el plásmido de expresión, ya que se descubrió que la coexpresión de esta proteína chaperona mejora el rendimiento de Fab' humanizado en la cepa MXE016 de *E. coli* (desvelada en el documento WO2011/086136) durante la fermentación continua, usando IPTG para inducir la expresión de Fab'. Las cadenas ligeras y pesadas de Fab' de 1519 y el polipéptido FkpA se expresaron a partir de un único multicistrón bajo el control del promotor tac inducible por IPTG.

Para la expresión en células de mamíferos, los genes de la región V de cadena ligera humanizada se clonaron en el vector de expresión de cadena ligera humana UCB-Celltech pMhCK, que contiene ADN que codifica la región constante de cadena Kappa humana (alotipo Km3). Los genes de la región V de cadena pesada humanizada se clonaron en el vector de expresión de cadena pesada gamma 4 humana UCB-Celltech pMhg4P DV, que contiene ADN que codifica la región constante de cadena pesada gamma-4 humana con la mutación estabilizadora de la bisagra S241P (Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30(1):105-8). La cotransfección de vectores de cadena ligera y pesada en células HEK293 en suspensión se logró usando 293 Fectina (12347-019 Invitrogen), y dio expresión de los anticuerpos 1519 recombinantes humanizados.

Ejemplo 1A Preparación del conjugado Fab'-PEG de 1519.g57

EL Fab' expresado en el periplasma de *E. coli* se extrajo de las células mediante extracción por calor. Fab' se purificó mediante purificación por afinidad con proteína G con una elución ácida. Fab' se redujo y PEGiló con PEG de 40 kDa (SUNBRIGHT GL2-400MA3). El PEG está unido covalentemente a través de un grupo de maleimida a uno o más grupos tiol en el fragmento de anticuerpo. La eficacia de la PEGilación se confirmó mediante SE-HPLC. El Fab'PEG se separó de los diFab' y Fab' no PEGilados mediante cromatografía de intercambio catiónico. Las fracciones se analizaron mediante SE-HPLC y SDS-PAGE. La agrupación se realizó para minimizar niveles de impurezas. La muestra final se concentró y se dializó en el tampón deseado.

Ejemplo 1B Preparación de Fab' de 1519.g57 (Anti-FcRn humano) conjugado con albúmina de suero humano

Fab' de 1519.g57 anti-FcRn humano se conjugó químicamente con albúmina de suero humano (derivado recombinante) que luego se usó para estudios en animales.

- Albúmina de suero humano: Recombumina de Novozyme (número de catálogo: 200-010) presentada como solución al 20 % p/v producida de forma recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Fab' de 1519.g57: 30 mg/ml presentado en fosfato de sodio 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 6,0 (tampón de reducción)
- 1,6-bismaleimidohexano (BMH) de Thermo fisher (número de catálogo 22330)

Reducción de albúmina:

La albúmina se redujo utilizando clorhidrato de cisteamina recién preparado (nº de catálogo Sigma: 30078) que se preparó en tampón de reducción. A la solución de albúmina, se añadió clorhidrato de cisteamina a un exceso molar de 10 veces y luego se incubó a 37 °C al baño de agua durante 30 minutos. Después de la reducción, la solución se desaló utilizando columnas PD10 (GE Healthcare n.º de catálogo 17-0851-01) para eliminar cualquier exceso de agente reductor.

Adición del enlazador BMH:

Se preparó una solución madre de 1,6-bismaleimidohexano en un vial de vidrio usando dimetilformamida. La solución se agitó en vórtex para asegurar la disolución completa de BMH.

Se añadió solución de BMH a la solución de albúmina reducida desalada en un exceso molar de 10 veces con respecto a la concentración de albúmina. La solución se incubó luego a 37 °C durante 30 minutos, seguido de una incubación durante la noche a temperatura ambiente en un rodillo para asegurar una mezcla adecuada. Se observó un precipitado blanco que se centrifugó utilizando una centrifuga de sobremesa.

Una vez completada la reacción, la solución se desalinizó utilizando columnas PD10.

Reducción de Fab' de 1519.g57

Fab' de 1519.g57 se redujo usando clorhidrato de cisteamina recién preparado (nº de catálogo Sigma: 30078) que se

preparó en tampón de reducción. A la solución de Fab' de 1519.g57, se añadió clorhidrato de cisteamina a un exceso molar de 10 veces y luego se incubó a 37 °C al baño de agua durante 30 minutos. Después de la reducción, la solución se desaló utilizando columnas PD10 (GE Healthcare n.º de catálogo: 17-0851-01) para eliminar cualquier exceso de agente reductor.

Mezcla de Fab reducido y albúmina-BMH

Se añadieron cantidades iguales (en términos molares) de Fab' reducido y enlazador de albúmina y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche en un mezclador de rodillos.

Purificación por afinidad:

La mezcla anterior se purificó luego por afinidad utilizando Blue Sepharose que se unió al conjugado de albúmina-Fab y la albúmina libre. La purificación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que se describen brevemente aquí:

la Blue Sepharose se reconstituyó en DPBS pH 7,4 y se lavó tres veces con PBS. Después del lavado, se añadió la mezcla de Fab y albúmina enlazada al enlazador y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en un mezclador de rodillos. Después de la incubación, la matriz se lavó nuevamente con PBS para eliminar cualquier material no unido y luego se eluyó con PBS 7,4 que contenía KCl 2 M.

Purificación por exclusión de tamaño:

El material purificado por afinidad contenía albúmina conjugada con Fab junto con algo de HSA sin reaccionar. Esto requirió una limpieza adicional y esto se logró mediante cromatografía de exclusión por tamaño (S200 16X60 de GE Healthcare). Las fracciones combinadas finales se presentaron en DPBS pH 7,4. El conjugado final Fab-HSA de 1519.g57 se concentró hasta 20 mg/ml en DPBS pH 7,4 y se analizó en cromatografía de exclusión de tamaño analítico (Agilent Zorbax GF250 y GF450 en tándem) y se encontró que era un conjugado predominantemente monomérico. También se llevó a cabo el ensayo de endotoxinas y se encontró que la muestra estaba por debajo del límite inferior especificado de contenido de endotoxinas.

Ejemplo 2 Selección de moléculas candidatas a Fab' y Fab'PEG en el ensayo de reciclado de IgG

Para determinar la capacidad de las moléculas Fab'PEG candidatas para inhibir la actividad de FcRn en un ensayo de células funcionales, se seleccionaron moléculas en el ensayo de reciclado de IgG (descrito con más detalle en el Ejemplo 5). En resumen, las células del clon 34 de MDCK II se incubaron previamente con Fab' o Fab'PEG candidato antes de la adición de IgG humana biotinilada en un tampón ácido. Las células se lavaron para eliminar todo el exceso de IgG y luego se incubaron en un tampón de pH neutro para facilitar la liberación de IgG en el sobrenadante. La cantidad de IgG liberada en el sobrenadante se midió mediante el ensayo MSD y se calcularon los valores de CE₅₀. Los valores de CE₅₀ de las moléculas candidatas de Fab' y Fab'PEG humanizadas que inhiben el reciclado de IgG se muestran en la tabla a continuación. Tras la PEGilación, existe una pérdida de potencia para todos los anticuerpos candidatos, sin embargo, la extensión varía según el candidato.

Tabla 1

Anticuerpo	CE ₅₀ (nM) de Fab'	(n)	CE ₅₀ (nM) de Fab'PEG	(n)	Factor de cambio en CE ₅₀ después de la pegilación
CA170_0519.g63	1,91	3	5,25	3	2,7
CA170_0519.g57	2,06	7	6,64	6	3,2
CA170_0519.g2	4,22	2	11,01	4	2,6

Valores medios de CE₅₀ para las moléculas Fab' y Fab'PEG en el ensayo de reciclado de IgG.

Las células del clon 34 de MDCK II transfectadas de manera estable con FcRn humano y beta 2 microglobulina estaban a 25.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se incubaron con Fab' o Fab'PEG candidato en HBSS+ (Ca/Mg) pH 5,9 + BSA al 1 % durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 % antes de la adición de 500 ng/ml de IgG humana biotinilada (Jackson) e incubación durante 1 hora más. Las células se lavaron con HBSS+ pH 5,9 y luego se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 2 horas en HBSS+ pH 7,2. El sobrenadante se eliminó de las células y se analizó para determinar la IgG total utilizando un ensayo MSD (usando un anticuerpo de captura anti-IgG humana (Jackson) y un anticuerpo revelador de marcador de estreptavidina-sulfo (MSD)). La curva de inhibición se analizó mediante regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar la CE₅₀. La tabla 1 representa datos combinados de 2 a 7 experimentos.

Ejemplo 3 Afinidad para la unión de hFcRn

El análisis de interacción biomolecular utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizó en un sistema Biacore T200 (GE Healthcare) y se determinó la unión al dominio extracelular de FcRn humano. El

dominio extracelular de FcRn humano se proporcionó como un complejo no covalente entre el dominio extracelular de la cadena alfa de FcRn humano (SEQ ID NO: 94) y la $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) (SEQ ID NO: 95). El fragmento F(ab')₂ Affinipure de cabra anti-IgG humana, el fragmento específico F(ab')₂ (para la captura de Fab'-PEG) o el fragmento específico Fc (para la captura de IgG1 o IgG4) (Jackson ImmunoResearch Lab, Inc.) en NaAc 10 mM, pH 5 se inmovilizó en un chip de sensor CM5 a través de la química de acoplamiento de amina a un nivel de captura entre 4000 - 5000 unidades de respuesta (UR) utilizando HBS-EP+ (GE Healthcare) como tampón de ejecución.

Fosfato 50 mM, pH 6 + NaCl 150 mM + P20 o HBS-P al 0,05 %, pH 7,4 (GE Healthcare) se usó como tampón de ejecución para el ensayo de afinidad. El anticuerpo en cuestión, ya sea anti-Fab'-PEG de hFcRn, IgG1 o IgG4P se diluyó a 5 μ g/ml (Fab'-PEG), 0,3 μ g/ml (IgG1) o 4 μ g/ml (IgG4) en un tampón de ejecución. Se utilizó una inyección de 60 s de Fab'-PEG o IgG1 o IgG4 a 10 μ l/min para la captura mediante la anti-IgG humana inmovilizada, F(ab')₂. El dominio extracelular de FcRn humano se valoró de 20 nM a 1,25 nM sobre el anticuerpo anti-FcRn capturado (Fab'-PEG, IgG1 o IgG4) durante 300 s a 30 μ l/min, seguido de una disociación de 1200 s. La superficie se regeneró con 2 x 60 s HCl 50 mM a 10 μ l/min.

Los datos se analizaron utilizando el software de evaluación T200 (versión 1.0).

Tabla 2 Datos de afinidad para anti-hFcRn de Fab'-PEG de 1519.g57 a pH 6

Fab'-PEG de 1519.g57	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)
1	4.37E,+05	1.59E,-05	3.63E,-11
2	4.20E,+05	2.01E,-05	4.78E,-11
3	4.35E,+05	1.43E,-05	3.29E,-11
4	4.37E,+05	2.75E,-05	6.30E,-11
5	4.33E,+05	1.28E,-05	2.97E,-11
	4.32E,+05	1.81E,-05	4.19E,-11

Tabla 3 Datos de afinidad para anti-hFcRn de Fab'-PEG de 1519.g57 a pH 7,4

Fab'-PEG de 1519.g57	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)
1	3.40E,+05	1.87E,-05	5.49E,-11
2	3.31E,+05	1.85E,-05	5.58E,-11
3	3.25E,+05	1.99E,-05	6.13E,-11
4	3.23E,+05	1.52E,-05	4.70E,-11
5	3.20E,+05	1.99E,-05	6.21E,-11
	3.28E,+05	1.84E,-05	5.62E,-11

En estos experimentos, el Fab'PEG tenía una afinidad promedio de alrededor de 42 pM a pH 6 y alrededor de 56 pM a pH 7,4.

pH7.4

Tabla 3A Datos de afinidad para anti-1519.g57 de hFcRn como IgG1 e IgG4P a pH 7,4 (promedio de tres experimentos)

1519.g57	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)	KD (pM)
IgG1	3.80E,+05	1.25E,-05	3.29E,-11	33
IgG4P	3.68E,+05	1.26E,-05	3.43E,-11	34

pH6

Tabla 3b Datos de afinidad para anti-1519.g57 de hFcRn como IgG1 e IgG4P a pH 6 (promedio de tres experimentos)

1519.g57	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)	KD (pM)
IgG1	4.56E,+05	1.01E,-05	2.21E,-11	22
IgG4P	4.43E,+05	1.00E,-05	2.26E,-11	23

Las tablas 3A y 3B muestran que la afinidad de los anticuerpos de longitud completa es consistente con la observada para el Fab'-PEG a pH 6 y pH 7,4.

Ejemplo 4 Potencia basada en células

Los ensayos basados en células se realizaron utilizando células de Riñón Canino Madin-Darby (MDCK) II que se habían transfectado de manera estable con un vector de doble gen FcRn humano y B2M humana con un marcador

de selección de Geneticina. Se seleccionó un clon celular estable que era capaz de reciclar y transitar IgG humana y se usó para todos los estudios posteriores. Será referido como clon 34 de MDCK II.

Afinidad basada en células de Fab'PEG de CA170_01519.g57 para FcRn humano

Se realizaron experimentos de citometría de flujo cuantitativo utilizando células del clon 34 de MDCK II y Fab' de CA170_01519.g57 o Fab'PEG de CA170_01519.g57 marcado con AlexaFluor 488. La unión específica del anticuerpo a FcRn en un intervalo de concentraciones de anticuerpos se usó para determinar la KD. Los análisis se realizaron en tampones neutros y ácidos para determinar si el pH ambiental comparable al encontrado en el plasma sanguíneo (pH 7,4) o en los endosomas (pH 6) tuvo algún efecto sobre la unión del anticuerpo.

La Figura 3 muestra curvas de unión representativas para Fab' (Figura 3A) y Fab'PEG (Figura 3B) de CA170_01519.g57. Los valores medios de KD (n = 2 o 3) fueron 1,66 nM y 6,5 nM en un tampón neutro, y 1,59 nM y 5,42 nM en un tampón ácido, respectivamente (véase la Tabla 4).

Tabla 4 - Valores medios de KD (nM) para Fab' y Fab'PEG de CA170_01519.g57 en células del clon 34 de MDCK II.

Formato de anticuerpos	FcRn humano pH 7,4	FcRn humano pH 6,0
Fab' de 1519.g57	1,66	1,59
Fab'PEG de 1519.g57	6,5	5,42

La **Figura 3** muestra Fab' de CA170_01519.g57 (A) y Fab'PEG de CA170_01519.g57 (B) que se unen a las células del clon 34 de MDCK II en pH ácido y neutro.

Las células del clon 34 de MDCK II se incubaron en tampón FACS (PBS con BSA al 0,2 % p/v, NaN₃ al 0,09 % p/v) durante 30 minutos antes de la adición de Fab' o Fab'PEG de CA170_01519.g57 marcado con Alexa-fluor 488 durante 1 hora en tampón FACS a pH 7,4 o pH 6. Las concentraciones finales de anticuerpos oscilaron entre 931 nM y 0,002 nM. Las células se lavaron en tampón FACS enfriado con hielo y luego se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo de Guava (Millipore, Reino Unido). También se produjeron conjuntos de datos de valoración para los anticuerpos de control de isotipo para cada formato de anticuerpo para determinar la unión no específica. El número de moles de anticuerpo unido se calculó utilizando valores interpolados de una curva estándar generada a partir de perlas que comprenden cantidades diferentes de tinte fluorescente. Los valores medios geométricos de fluorescencia se determinaron en los análisis citométricos de flujo de células y perlas. La unión no específica se restó de los valores de anticuerpos anti-FcRn y la curva de unión específica generada se analizó mediante regresión no lineal utilizando una ecuación de unión de un sitio (Graphpad Prism®) para determinar la KD. Los datos son representativos de 2 o 3 experimentos.

Fab'PEG de CA170_01519.g57 puede unirse a FcRn humano expresado en células a pH tanto ácido como neutro y los valores de KD determinados son aproximadamente de 3,5 a 4 veces por debajo de la molécula de Fab' equivalente.

Ejemplo 5 Ensayos funcionales basados en células

Fab'PEG de CA170_01519.g57 inhibe el reciclado de IgG humana

La expresión de FcRn es principalmente intracelular (Borvak J et al. 1998, Int. Immunol., 10 (9) 1289-98 y Cauza K et al. 2005, J. Invest. Dermatol., 124 (1), 132-139), y está asociada a membranas endosomales y lisosomales. La porción Fc de IgG se une a FcRn a pH ácido (< 6,5), pero no a un pH fisiológico neutro (7,4) (Rhagavan M et al. 1995) y esta dependencia del pH facilita el reciclado de IgG.

Una vez que se toma mediante pinocitosis y entra en el endosoma ácido, la IgG unida a FcRn se reciclará junto con el FcRn a la superficie celular, mientras que al pH fisiológicamente neutro se liberará la IgG. (Ober RJ et al. 2004, The Journal of Immunology, 172, 2021-2029). Cualquier IgG no unida a FcRn entrará en la ruta de degradación lisosomal.

Se estableció un ensayo *in vitro* para examinar la capacidad de Fab'PEG o Fab' de CA170_01519.g57 para inhibir las capacidades de reciclado de IgG de FcRn. En resumen, las células del clon 34 de MDCK II se incubaron en presencia o ausencia de Fab' de CA170_01519.g57 o Fab'PEG de CA170_01519.g57 antes de la adición de IgG humana biotilada en un tampón ácido (pH 5,9) para permitir la unión a FcRn. Se eliminó todo el exceso de anticuerpo y las células se incubaron en un tampón de pH neutro (pH 7,2) que permite la liberación de IgG unida, expuesta a la superficie, en el sobrenadante. La inhibición de FcRn se siguió utilizando en un ensayo MSD para detectar la cantidad de IgG reciclada y, por lo tanto, liberada en el sobrenadante.

La **Figura 4** muestra que CA170_01519.g57 inhibe el reciclado de IgG en las células del clon 34 de MDCK II. Las células del clon 34 de MDCK II se colocaron en placas a 25.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se

incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se incubaron con Fab' o Fab'PEG de CA170_01519.g57 en HBSS+ (Ca/Mg) pH 5,9 + BSA al 1 % durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 % antes de la adición de 500 ng/ml de IgG humana biotinilada (Jackson) e incubación durante 1 hora más. Las células se lavaron con HBSS+ pH 5,9 y luego se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 2 horas en HBSS+ pH 7,2. El sobrenadante se eliminó de las células y se analizó para determinar la IgG total utilizando un ensayo MSD (usando un anticuerpo de captura anti-IgG humana (Jackson) y un anticuerpo revelador de marcador de estreptavidina-sulfo (MSD)). La curva de inhibición se analizó mediante regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar la CE₅₀. El gráfico representa datos combinados de 6 o 7 experimentos.

Como se muestra en la **Figura 4**, Fab' de CA170_01519.g57 y Fab'PEG de CA170_01519.g57 inhiben el reciclado de IgG de una manera dependiente de la concentración con valores medios de CE₅₀ (n = 6 o 7) de 1,937 nM y 6,034 nM respectivamente. Por lo tanto, el Fab'PEG de CA170_01519.g57 es aproximadamente 3 veces menos potente que el Fab' de CA170_01519.g57 en la inhibición del reciclado de IgG.

Fab'PEG de CA170_01519.g57 inhibe la transcitosis de IgG humana

FcRn puede transitar la IgG a través de las capas de células epiteliales polarizadas en las direcciones apical a basolateral y basolateral a apical y, por lo tanto, desempeña un papel importante al permitir que la IgG se mueva entre la circulación y el lumen en las barreras mucosas (Claypool et al. 2004 Mol Biol Cell 15(4):1746-59).

Se estableció un ensayo *in vitro* para examinar la capacidad de Fab'PEG de CA170_01519.g57 para inhibir la transcitosis de IgG dependiente de FcRn. En resumen, las células del clon 34 de MDCK II se colocaron en una placa Transwell de 24 pocillos y se dejaron formar monocapas durante 3 días. Las células se incubaron previamente con Fab'PEG de CA170_01519.g57 en la superficie apical antes de la adición de IgG humana biotinilada en un tampón ácido que facilita la unión a FcRn. La IgG humana se transcitosa a través de las células del lado apical al basolateral y se libera en un tampón neutro en la cámara inferior. Los niveles de IgG en el lado basolateral se midieron luego utilizando un ensayo MSD.

La **Figura 5** muestra que Fab'PEG de CA170_01519.g57 inhibe la transcitosis de IgG desde la apical hasta la basolateral en las células del clon 34 de MDCK II.

Las células del clon 34 de MDCK II se colocaron en placas a 500.000 células por pocillo de una placa Transwell de 24 pocillos y se incubaron durante 3 días a 37 °C, CO₂ al 5 % hasta que se formaron las monocapas. El pH del compartimiento apical se ajustó a 5,9 y el lado basolateral a 7,2 en un tampón HBSS+ (Ca/Mg) + BSA al 1 %. Las células en el compartimiento apical se preincubaron con Fab'PEG de CA170_01519.g57 durante 1 hora antes de la adición de 2,5 µg/ml de IgG humana biotinilada (Jackson) en las concentraciones indicadas durante 4 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Luego se recogió el medio basolateral y se midió la IgG total mediante el ensayo de MSD (utilizando un anticuerpo de captura anti-IgG humana (Jackson) y un anticuerpo revelador de marcador de estreptavidina-sulfo (MSD)). La curva de inhibición se analizó mediante regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar la CE₅₀. El gráfico representa datos combinados de 3 experimentos.

En resumen, la Figura 5 muestra que Fab'PEG de CA170_01519.g57 puede inhibir la transcitosis apical a basolateral de la IgG humana de una manera dependiente de la concentración con un valor de CE₅₀ de 25,5 nM (n = 3).

Resumen de los efectos *in vitro* de Fab'PEG de CA170_01519.g57

El Fab'PEG de CA170_01519.g57 inhibe el reciclado de IgG y la transcitosis. La CE₅₀ de 6 nM obtenida en el ensayo de reciclado de IgG es comparable a los datos de afinidad de unión celular en los que se obtuvieron valores de KD de 6,5 nM en tampón neutro y 5,42 nM en tampón ácido. El Fab'PEG de CA170_01519.g57 muestra una ligera reducción en la potencia en comparación con el Fab' solo, pero en comparación con muchas de las otras moléculas candidatas evaluadas mostró la menor caída en la potencia entre los dos formatos (véase *supra*). En el ensayo de transcitosis de IgG se obtuvo una CE₅₀ de 25,5 nM.

Los datos en esta sección han demostrado claramente que el Fab'PEG de CA170_01519.g57 puede inhibir la función de FcRn humano.

Ejemplo 6 Reactividad cruzada de Fab'PEG de CA170_01519.g57 con FcRn de primate no humano.

Para validar el uso de Fab'PEG de CA170_01519.g57 en un estudio de PK/PD con primates no humanos y toxicología preclínica, se examinó su afinidad relativa y potencia funcional con FcRn de macaco. Se usaron células MDCK II transfectadas de manera estable con FcRn de macaco y B2M (MDCKII (cm)) para los siguientes estudios junto con las células MDCK II previamente descritas transfectadas de manera estable con FcRn humano y B2M (clon 34 de MDCK II).

Afinidad basada en células de Fab'PEG de CA170_01519.g57 para FcRn de macaco

Para determinar la afinidad de unión basada en células de Fab'PEG de CA170_01519.g57 para FcRn de macaco, se realizaron experimentos de citometría de flujo cuantitativo utilizando células MDCK II (cm) y Fab' o Fab'PEG de CA170_01519.g57 marcado con AlexaFluor 488. La unión específica del anticuerpo a FcRn de macaco en un intervalo de concentraciones de anticuerpos se usó para determinar la K_D . La unión del anticuerpo se realizó en pH tanto neutro como ácido para determinar el efecto de la unión de FcRn en plasma sanguíneo neutro o en endosomas ácidos y, por lo tanto, para determinar cualquier efecto que pueda tener el pH en la unión de CA170_01519.g57 a FcRn de macaco.

La **Figura 6** muestra Fab' de CA170_01519.g57 (A) y Fab'PEG de CA170_01519.g57 (B) que se unen a las células MDCK II (cm) en pH ácido y neutro.

Las células MDCK II (cm) se incubaron en tampón FACS (PBS con BSA al 0,2 % p/v, Na₃N al 0,09 % p/v) durante 30 minutos antes de la adición de Fab' o Fab'PEG de CA170_01519.g57 marcado con Alexa-fluor 488 durante 1 hora en tampón FACS a pH 7,4 o pH 6. Las concentraciones finales de anticuerpos oscilaron entre 931 nM y 0,002 nM. Las células se lavaron en tampón FACS enfriado con hielo y luego se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo de Guava (Millipore, Reino Unido). También se produjeron conjuntos de datos de valoración para los anticuerpos de control de isotipo para cada formato de anticuerpo para determinar la unión no específica. El número de moles de anticuerpo unido se calculó mediante la utilización de valores interpolados de una curva estándar generada a partir de perlas que llevan varias cantidades de tinte fluorescente. Los valores medios geométricos de fluorescencia se determinaron en los análisis citométricos de flujo de células y perlas. La unión no específica se restó de los valores de anticuerpos anti-FcRn y la curva de unión específica generada se analizó mediante regresión no lineal utilizando una ecuación de unión de un sitio (Graphpad Prism®) para determinar la K_D . Los datos son representativos de entre 2 y 3 experimentos.

Tabla 5 Valores medios de K_D (nM) para Fab' y Fab'PEG de CA170_01519.g57 en células MDCK II (cm).

Formato de anticuerpos	Cyno FcRn pH 7,4	Cyno FcRn pH 6,0
Fab' de 1519.g57	1,16	1,09
Fab'PEG de 1519.g57	8,15	5,01

La Figura 6 muestra curvas de unión representativas para la unión de Fab' (Figura 6A) y Fab'PEG (Figura 6B) de CA17001519.g57 a FcRn de macaco. Los valores medios de K_D obtenidos para Fab' y Fab'PEG de CA17001519.g57 se muestran en la Tabla 5. Estos valores son comparables a los valores de K_D obtenidos para la unión de Fab' y Fab'PEG de CA170_01519.g57 a FcRn humano (véase la tabla 4)

Fab'PEG de CA170_01519.g57 inhibe el reciclado de IgG de macaco

Para determinar si Fab'PEG de CA170_01519.g57 es funcionalmente activo en la inhibición de FcRn de macaco, se usaron células MDCK II (cm) para examinar la capacidad de Fab'PEG de CA170_01519.g57 para inhibir el reciclado de la IgG de macaco como se describe previamente para el ensayo de FcRn humano. El ensayo se realizó junto con ensayos humanos representativos para permitir una comparación entre los dos.

En resumen, las células MDCK II (clon 34 o cm) se incubaron previamente con Fab'PEG de CA170_01519.g57 antes de la adición de IgG humana biotilada (h) o de macaco (c) en un tampón ácido para permitir la unión a FcRn. Se eliminó todo el exceso de Fab'PEG de CA170_01519.g57 e IgG biotilada y las células se incubaron en un tampón de pH neutro para permitir la liberación de IgG en el sobrenadante. La inhibición de FcRn se evaluó mediante la detección de la cantidad de IgG presente en el sobrenadante mediante el ensayo de MSD y se calculó el porcentaje de inhibición.

Como se muestra en la **Figura 7**, Fab'PEG de CA170_01519.g57 puede inhibir el reciclado de IgG humana y de macaco de una manera dependiente de la concentración, con valores de CE_{50} de 8,448 nM y 5,988 nM respectivamente. La inhibición de FcRn mediante Fab'PEG de CA170_01519.g57 en los ensayos humano y de macaco son comparables, aunque parece ser un poco más potente contra el FcRn de macaco.

Tabla 6

	hFcRn:hlgG de Fab'PEG de 1519.g57	cFcRn:clgG de Fab'PEG de 1519.g57
CE50 (nM)	8,448	5,988
CI al 95 % (nM)	6,560 a 10,88	5,383 a 6,661

La **Figura 7** muestra que CA170_01519.g57 inhibe el reciclado de IgG en las células del clon 34 de MDCK II y células MDCK II (cm).

Las células del clon 34 de MDCK II y MDCK II (cm) se colocaron en placas a 25.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se incubaron previamente con Fab' o Fab'PEG de CA170_01519.g57 en HBSS+ (Ca/Mg) pH 5,9 + BSA al 1 % durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 % antes

de la adición de 500 ng/ml de IgG de macaco o humana biotinilada y se incubación durante 1 hora más. Las células se lavaron luego con HBSS+ pH 5,9 y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 2 horas en HBSS+ pH 7,2. El sobrenadante se eliminó de las células y se analizó para determinar la IgG total utilizando un ensayo MSD (usando un anticuerpo de captura anti-IgG humana (Jackson) y un anticuerpo revelador de marcador de estreptavidina-sulfo (MSD)). La curva de inhibición se analizó mediante regresión no lineal (Graphpad Prism®) para determinar la CE₅₀. El gráfico representa datos combinados de 2 experimentos.

Ejemplo 7 Efecto de Fab PEG de 01519g en macaco

Este fue un estudio del efecto de la administración de Fab PEG de 01519g en macacos, en regímenes de dosis únicas, intermitentes o repetidas. Se administró Fab PEG de 01519g mediante infusión intravenosa, como una dosis única o en dosis repetidas a grupos de cuatro macacos como se indica en la Tabla 7. La IgG en plasma y la farmacocinética de Fab PEG de 01519g se controlaron mediante inmunoensayo (véase la Tabla 7A para los métodos de inmunoensayo) y LC-MS/MS. El ensayo de albúmina en plasma se realizó en Covance.

Tabla 7 Grupos de dosis en estudio NCD2241. La dosificación se realizó mediante infusión intravenosa. La dosis repetida fue la misma que la primera dosis en cada caso. Las dosis repetidas (de 4) fueron semanales.

Fase	Grupo	Anticuerpo	Dosis (mg/kg)	Régimen de dosificación	Comentarios
I	1	Control	0	Dosis única	Dosis repetida a los 67 días
	2	Fab PEG	20	Dosis única	Dosis repetida a los 67 días
	3	Fab PEG	100	Dosis única	Dosis repetida a los 67 días
II	4	Control	0	Dosis repetida	
	5	Fab PEG	20	Dosis repetida	
	6	Fab PEG	100	Dosis repetida	

Tabla 7A Métodos de inmunoensayo de IgG en plasma, PK y ADA

Tipo de ensayo	Inmunoensayo	Método
PD	IgG en plasma total	1) Cubrir la placa de inmunoensayo con F(ab') ₂ de cabra anti-Fcγ humano 2) Incubar con la muestra. 3) Revelar con F(ab') ₂ conjugada con peroxidasa de rábano picante, F(ab') ₂ de cabra anti-IgG humana y la adición de sustrato TMB.
PK	PK de Fab PEG	1) Cubrir la placa de inmunoensayo con FcRn. 2) Incubar con la muestra. 3) Revelar con anti-IgG1 PEG murina conjugada de biotina /conjugado de estreptavidina-proxidasa de rábano picante y la adición de sustrato TMB. Revelar alternativamente con MSD de cabra anti-kappa humana marcada con sulfo y la adición de tampón de lectura MSD

Efecto sobre la concentración de IgG en plasma

Los datos de inmunoensayo y LC-MS/MS de IgG en plasma estuvieron de acuerdo. La IgG en plasma se redujo mediante la administración de Fab PEG (véase la Figura 12 y Figura 14). Para ambos grupos de dosis de Fase I, una dosis única de Fab PEG redujo la IgG en plasma en aproximadamente un 70-80 %, alcanzando un nadir en aproximadamente 7 días y volviendo a los niveles previos a la dosis en el día 63. La dosis repetida en el día 67 logró resultados similares.

Para ambos grupos de dosis de Fase II, 4 dosis semanales de Fab PEG redujeron la IgG en plasma en aproximadamente un 70-80 %, alcanzando nuevamente un nadir aproximadamente 7 días después de la primera dosis. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 8 Efecto de Fab'PEG de CA170_01519.g57 e IgG4P de CA170_01519.g57 en macaco

Los efectos de Fab'PEG de CA170_01519 g.57 e IgG4P de CA170_01519 g.57 en IgG en plasma endógeno se determinaron en macacos. Se dosificaron los animales como se indica en la Tabla 8, con 4 animales por grupo de tratamiento. La IgG en plasma y la farmacocinética de las entidades anti-FcRn se controlaron mediante

inmunoensayo (véase la Tabla 8A para los métodos de inmunoensayo) y LC-MS/MS.

Tabla 8 Regímenes de tratamiento en macacos.

Anti-FcRn	Dosis (mg/kg)	Régimen de dosificación	Vía	Figura
Fab'PEG	20	Día 0 & 65	i.v.	15
Fab'PEG	20	Cada 3 días, día 0-27	i.v.	16
IgG4P	30	Día 0 & 63	i.v.	17
IgG4P	30 & 5	30 mg/kg en el día 0, 5 mg/kg diariamente los días 1-41	i.v.	18
Control	0	Diariamente los días 0-41	i.v.	19

Tabla 8A Métodos de inmunoensayo de IgG en plasma y PK

Tipo de ensayo	Inmunoensayo	Método
PD	IgG en plasma total	1) Cubrir la placa de inmunoensayo con F(ab') ₂ de cabra anti-Fcγ humano. 2) Incubar con la muestra. 3) Revelar con F(ab') ₂ conjugada con peroxidasa de rábano picante, F(ab') ₂ de cabra anti-IgG humana y la adición de sustrato TMB.
PK	PK de Fab'PEG	1) Cubrir la placa de estreptavidina MSD con FcRn biotinilado. 2) Incubar con la muestra. 3) Revelar con MSD de cabra anti-kappa humana marcada con azufre y la adición de tampón de lectura MSD.

Efecto sobre la concentración de IgG en plasma.

Los datos de inmunoensayo y LC-MS/MS de IgG en plasma estuvieron de acuerdo. La IgG en plasma se redujo mediante la administración de Fab'PEG anti-FcRn o IgG4P anti-FcRn (véase las Figuras 15 y 16 y las Figuras 17 y 18, respectivamente; véase la Figura 19 para el control). Para ambas entidades anti-FcRn, una dosis única redujo la IgG en plasma en aproximadamente un 70-80 %, alcanzando un nadir en aproximadamente 7 días y volviendo a los niveles previos a la dosis en el día 62. La dosis repetida en el día 63 o el día 65, según lo descrito, logró resultados similares.

La dosificación repetida de Fab'PEG o IgG4P anti-FcRn redujo la IgG en plasma en aproximadamente un 60-80 % y mantuvo el nivel de IgG durante la duración del período de dosis. De nuevo, el nadir se alcanzó aproximadamente 7 días después de la primera dosis. Los resultados se muestran en las Figuras 16 y 18.

Ejemplo 9 Efecto de Fab'PEG de CA170_01519.g57, IgG1 de CA170_01519.g57, IgG4P de CA170_01519.g57, Fab'PEG de CA170_01519.g57, FabFv de CA170_01519.g57 y Fab de CA170_01519.g57 en ratones transgénicos con hFcRn

El efecto de varios formatos diferentes del anticuerpo CA170_01519.g57 sobre el aclaramiento de la IVIG humana se determinó en ratones transgénicos con FcRn humano. Los formatos probados fueron Fab'PEG de CA170_01519.g57, IgG1 de CA170_01519.g57, IgG4P de CA170_01519.g57, Fab'PEG de CA170_01519.g57, FabFv de CA170_01519.g57 y Fab de CA170_01519.g57 y los resultados se muestran en las Figuras 20, 21, 22, 23 y 24 respectivamente. Las dosis únicas de compuesto activo fueron las que se muestran en las Figuras. Con el fin de detectar sus efectos sobre el aclaramiento de la IgG humana (IVIG), a los ratones se les inyectaron 500 mg/kg de IVIG humana que se cuantificó mediante LCMSMS en muestras seriadas de plasma extraídas de las colas de los ratones a intervalos. La inhibición de hFcRn por cada uno de los diferentes formatos de anticuerpos probados dio como resultado un aclaramiento acelerado de hIVIG y se observaron concentraciones más bajas de IgG total en comparación con los ratones de control.

El tratamiento anti-FcRn mejora el aclaramiento de hIgG en ratones transgénicos con hFcRn

Ratones transgénicos humanizados con FcRn (*B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}* Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ, ratones JAX) se infundieron por vía intravenosa con 500 mg/kg de IgG humana (Igl humana Gamunex-c al 10 %, Talecris Biotherapeutics). 24 horas después, a los animales se les administró un control de vehículo (PBS) o anti-FcRn por vía intravenosa como una dosis única. Se tomaron muestras de sangre de la punta de la cola a las -24, 8, 24, 48, 72, 144 y 192 horas en relación con el tratamiento anti-FcRn. Los niveles séricos de IgG humana en el ratón hFcRn y la farmacocinética de los inhibidores de FcRn se determinaron mediante LC-MS/MS. Los datos presentados en las figuras 20 a 24 son la media ± EEM con 3-6 ratones por grupo de tratamiento.

Cuantificación de IgG humana, inhibidores de FcRn e IgG de macaco endógena mediante LC-MS/MS

IgG humana, IgG de macaco e inhibidores de FcRn (Fab'PEG de 1519.g57, IgG4P de 1519.g57, IgG1 de 1519.g57,

FabFv de 1519.g57, Fab de 1519.g57 y Fab'HAS de 1519.g57) se cuantificaron utilizando análisis de cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS) después de digestión triptica.

La cuantificación se logró mediante la comparación con el material estándar auténtico enriquecido en concentraciones conocidas en la matriz en blanco, con la mioglobina de caballo enriquecida utilizada como estándar interno.

Se seleccionaron péptidos únicos ("proteotípicos") para todos los analitos de interés investigados y tanto las muestras como las muestras de calibración se digirieron de forma triptica como se describe a continuación.

En resumen, se realizó una digestión triptica de 5 µl de muestras de suero durante la noche usando tripsina modificada con grado de secuenciación (Promega, Southampton, Reino Unido) después de la desnaturalización con acetonitrilo / tris (2-carboxietil) fosfina y carbamido-metilación con yodoacetamida (todas de Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido).

Los analitos se separaron utilizando una columna Onyx Monolithic C18 (100x4,6 mm, Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido) con un gradiente del 2 al 95 % (v/v) de agua/acetonitrilo (ácido fórmico al 0,1 %) administrado a 1,5 ml/min durante 6 minutos.

El volumen de inyección fue de 10 µl; todo el eluyente se introdujo en la fuente del espectrómetro de masas.

La temperatura de la fuente del espectrómetro de masas se mantuvo a 600 °C y otros parámetros de la fuente (por ejemplo, energía de colisión, potencial de desintegración, presión del gas de cortina, etc.) se optimizaron para lograr la máxima sensibilidad para cada péptido de interés. Se monitorizaron las transiciones selectivas para cada péptido proteotípico de interés.

Ejemplo 10: Cristalografía y epítipo de unión.

Se determinó la estructura cristalina de Fab' de 1519 g57 y el dominio extracelular de FcRn humano desglucosilado (dominio extracelular de la cadena alfa (SEQ ID NO: 94) en asociación con la beta2 microglobulina (SEQ ID NO: 95), con la exclusión del oligosacárido de FcRn para facilitar la cristalización. Fab' de 1519.g57 se hizo reaccionar con un exceso molar de 10 veces de N-etil maleimida para evitar la formación de diFab' y cualquier diFab' existente eliminado por SEQ (S200 en Akta FPLC). El dominio extracelular de FcRn humano se trató con PNGaseF para eliminar los azúcares unidos a N. Para ello, la concentración de la muestra de FcRn se ajustó utilizando PBS (pH 7,4) a 5 mg/ml y un volumen total de 1 ml. Se añadieron 200 unidades de PNGaseF (Roche) a esta solución de FcRn humano. Esto se incubó a 37 °C durante ~ 18 horas, después de lo cual se verificó el grado de desglucosilación usando SDS PAGE. Una vez completada la reacción, el FcRn desglucosilado se intercambió con tampón en acetato de sodio 50 mM, NaCl 125 mM, pH 6,0.

El complejo se formó mediante la incubación de una mezcla de reactivos (Fab':FcRn::1,2:1, p/p) a temperatura ambiente durante 60 minutos, y luego se purificó utilizando SEQ (S200 usando Akta FPLC). La selección se realizó utilizando las diversas condiciones que estaban disponibles en Qiagen (aproximadamente 2000 condiciones). La incubación y las imágenes se realizaron con Formulatrix Rock Imager 1000 (para un período de incubación total de 21 días). El resultado de la selección se muestra en las Tablas 9, 10 y 11.

Tabla 9 El resultado del análisis de cristalización, que muestra el cristal utilizado para el análisis de rayos X.

Tipo de experimento de cristalización		Gota en sedestación, difusión de vapor	
Condición de cristalización	Citrato de sodio 0,1 mM, pH 5,5, PEG6000 al 11 %		
Concentración de proteína	10 mg/ml	Volumen/relación de gotas	0,4 µl de proteínas + 0.4 µl de reservorio
Tiempo de crecimiento de cristal	8-21 días		
Crioprotección	Los cristales se recogieron de la gota, se transfirieron a un tampón de crioprotección (reservorio al 70 % + etilenglicol al 30 %) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido (-180 °C) en 10 segundos.		

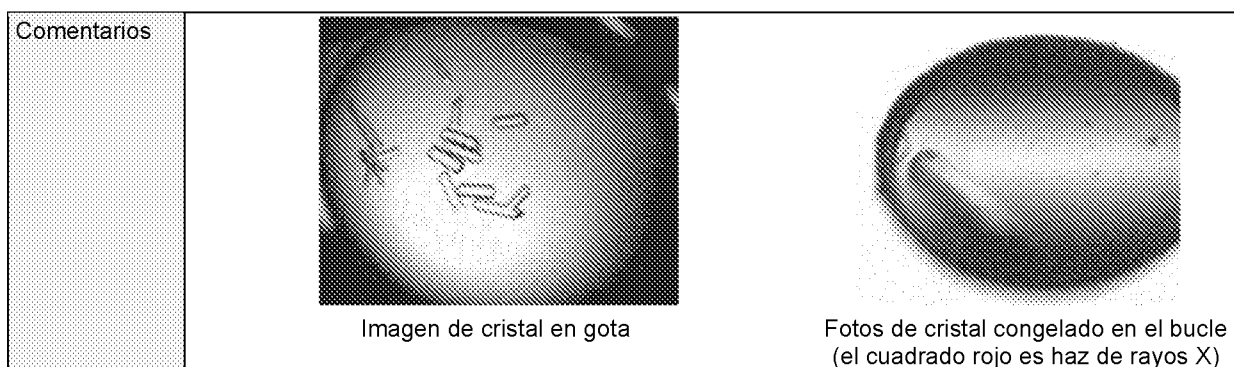


Tabla 10. Condiciones para la recolección y procesamiento de datos de análisis de rayos X.

Fuente de rayos x	Fuente de luz de diamante, Línea de luz I04					
Tipo de experimento	Longitud de onda única		Longitud de onda		0,9795 Å	
Software de procesamiento	Mosflm/Scala					
Límites de resolución	35,00- 2,90		Grupo espacial		P3 ₂ 2 1	
Parámetros de celda unitaria	a =	150,10 Å	b =	150,10 Å	c =	89,15 Å
	α =	90,00 °	β =	90,00 °	γ =	120,00 °
Completo	99,9 % (100,0 %)		Multiplicidad		6,7 (6,8)	
I/σ(I)	13,4 (4,8)		R _{fusión}		9,2 % (36,3 %)	
Número de reflexiones	172724 (25602)		Número de reflexiones únicas		25967 (3760)	
Comentarios						

Nota: Los números entre paréntesis se refieren a la capa exterior de resolución

Tabla 11 Determinación y refinamiento de la estructura

Método de determinación de estructura	Reemplazo Molecular	Programa(s) utilizado(s)	Phaser
Plantilla de estructura	Estructura del receptor FcRn de PDB 3M17 y Fab-3DVN previamente resuelto		
Programa de refinamiento	Refmac5	Límites de resolución	30,00- 2,9
Factor <i>R</i>	23,2 %	Factor <i>R</i> libre	28,4 %
Número de átomos no de hidrógeno	- 6125 átomos de proteína - 2 iones acetato (4 átomos cada uno) - 27 aguas en UA - 2 iones Cl ⁻ - 2 iones Na ⁺		
Longitud de enlace RMSD	0,009 Å	ángulo de enlace RMSD	1,338°
Ramachandran permitido	98,6 %	Ramachandran atípicos	1,4 %
Comentarios	Reconstruido utilizando CCP4/Coot.		

5

No hubo ningún cambio evidente en la estructura de FcRn tras la unión de Fab' de 1519 g57 (comparando este complejo con las estructuras publicadas de FcRn). A partir de la estructura cristalina, se calculó que el contenido de la estructura secundaria era: 9,4 % de α-hélice; 45,2 % de hoja β; 2,5 % de giro 3-10.

- 10 Los restos que interactúan con Fab' de 1519 g57 estaban todos en la cadena α de FcRn (no β2M) y se indican a continuación en **negrita**. Los restos en cuestión abarcan todos menos 1 de los restos críticos para la unión de Fc. 1519 g57 se une a una región que se superpone a la región de unión a Fc, lo que sugiere que la inhibición de FcRn mediante Fab' de 1519 g57 se realiza por simple competencia, siendo el anti-FcRn eficaz en virtud de su afinidad superior.

15

AESHLSLLYH LTAVSSPAPG TPAFWVSGWL GPQQYLSYNS
 LRGEAEP CGA WVENQVSWY WEKETDRLI KEKLFLEAFK ALGGKGPYTL
 QGLLGCELG **P** DNTSVPTAKF ALNGEEFMNF **DLKQGTWGGD WPEAL** AISQR
 WQQQDKAANK ELTFLLFSCP HRLREHLERG RGNLEWKEPP SMRLKARPSS

PGFSVLTCSA **FSFYPP**ELQL RFLRNGLAAG TGQGDFGPNS DGSFHASSSL
TVKSGDEHHY CCIVQHAGLA QPLRVELESPAKSS

- 5 La secuencia de la cadena α de FcRn, que muestra los restos implicados en la interacción con Fab' de 1519 g57 (negrita) y los restos críticos para la interacción con Fc de IgG (subrayado). Todos menos 1 de estos últimos están incluidos en los primeros.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo que comprende una cadena pesada o fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende tres CDR en donde la CDR H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, la CDR H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y la CDR H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3, y en donde el anticuerpo o fragmento de unión a FcRn del mismo comprende además una cadena ligera o fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende tres CDR, en donde la CDR L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, la CDR L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y la CDR L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6.
2. Un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 que está humanizado.
3. Un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que tiene una afinidad de unión por FcRn humano de 100 pM o menos cuando se mide a pH 6 y a pH 7,4.
4. Un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión se conjuga con un polímero.
5. Un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polímero se selecciona de almidón, albúmina y polietilenglicol (PEG).
6. Un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el polímero es PEG con un peso molecular en el intervalo de 5 a 50 kDa.
7. Un anticuerpo anti-FcRn de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa; opcionalmente, en donde el anticuerpo de longitud completa se selecciona del grupo que consiste en una IgG1, IgG4 e IgG4P.
8. Una molécula o moléculas de ADN aisladas que codifican una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7.
9. Un vector de clonación o expresión que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7.
10. Una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Un proceso para la producción de un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 10 y aislar el anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-FcRn o fragmento de unión a FcRn del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; opcionalmente, en donde la composición farmacéutica comprende adicionalmente otros principios activos.
13. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición como se define en la reivindicación 12 para su uso en terapia.
14. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición como se define en la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, tal como miastenia grave, pénfigo vulgar, neuromielitis óptica, síndrome de Guillain-Barré, lupus y púrpura trombocitopénica trombótica.
15. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición como se define en la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de CIDP, polineuropatía paraproteínica, epilepsia refractaria, ITP/TTP, anemia hemolítica, síndrome de Goodpasture, desapareamiento ABO, nefritis por lupus, vasculitis renal, esclerodermia, alveolitis fibrosante, miocardiopatía dilatada, enfermedad de Grave, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria, pénfigo, vasculitis ANCA, dermatomiositis, enfermedad de Sjogren o artritis reumatoide.

FIGURA 1

Secuencias del Ac CA170_1519

CDRH1

GFTFSNYGMV SEQ ID NO: 1

CDRH2

YIDSDGDNTYYRDSVKG SEQ ID NO: 2

CDRH3

GIVRPFLY SEQ ID NO: 3

CDRL1

RSSQSLVGASGKTYLY SEQ ID NO: 4

CDRL2

LVSTLDS SEQ ID NO: 5

CDRL3

LQGTHFFET SEQ ID NO: 6

Región VL del Ac 1519 de Rata SEQ ID NO: 7

DVVMQTPLS LSVALGQPAS ISCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQRSGQSPK
 RLIYLVSTLD SGIPDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLCV YYCLQGTHFP
 HTFGAGTKLE LK

Región VL del Ac 1519 de Rata SEQ ID NO: 8

gatgttgtga tgaccacagac tccactgtct ttgtcgggtg cccttggaca
 accagcctcc atctcttgca agtcaagtcg gagcctcgta ggtgctagtg
 gaaagacata tttgtattgg ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag
 cgactaatct atctggtgct cacactggac tctggaattc ctgataggtt
 cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tottaaaaatc cgcagagtgg
 aagccgatga ttgaggagtt tattactgct tgcaaggtac acattttcct
 cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa

Región VL del Ac 1519 de Rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 9

MMSPAQFLFL *LMLWIQGTSG* DVVMQTPLS LSVALGQPAS ISCKSSQSLV
 GASGKTYLYW LFQRSGQSPK RLIYLVSTLD SGIPDRFSGS GAETDFTLKI
 RRVEADDLCV YYCLQGTHFP HTFGAGTKLE LK

FIGURA 1A

Región VL del Ac 1519 de Rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 10

atgatgagtc ctgcccagtt ccgttttctg ctgatgctct ggattcaggg
aaccagtggt gatgttgta tgaaccagac tccactgtct ttgtcgggtg
cccttggaca accagcctcc atctcttga agtcaagtca gagcctcgta
ggtgctagtg gaaagacata tttgtattgg ttatttcaga ggtccggcca
gtctccaaag cgaactaatct atctgggtgc cacactggac totgggaatto
ctgatagggt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc
cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattaactgct tgcaaggtaac
acattttctc cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa

Región VH del Ac 1519 de Rata SEQ ID NO: 11

EVPLVBSGGG SVQPGRSMKL SCVVSGETFS NYGMVWVRQA PKKGLEWVAY
IDSDGNTYY RDSVKGRFTI SRNNAKSTLY LQMSLRSED TATYYCTGTI
VRPFLYWQGG TTVTVS

Región VH del Ac 1519 de Rata SEQ ID NO: 12

gaggtgcgc tgggtggagtc tgggggcgc tcagtgcagc ctgggaggtc
catgaaactc tctgtgtag tctcaggatt cactttcagt aattatggca
tgggtctgggt ccgccaggct ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat
attgattctg atggtgataa tacttactac cgagattccg tgaagggcg
attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccotatat ttgcaaatgg
acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt
gtccggccct ttctctattg gggccaagga accacggta ccgtctcg

Región VH del Ac 1519 de Rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 13

MDISLSLAFL VLFIKGVRC VPLVBSGGGS VQPGRSMKLS CVVSGETFSN
YGMVWVRQAP KKLEWVAYI DSDGNTYYR DSVKGRFTIS RNNAKSTLYL
QMSLRSED ATYYCTGTIV RPFLYWQGT TTVTVS

Región VH del Ac 1519 de Rata con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 14

atggacatca gtctcagctt ggctttcctt gtccttttca taaaagggtg
ccgggtgtgag gtgcogotgg tggagtctgg gggoggctca gtgcagcctg
ggaggtccat gaaactctcc tgtgtagtct caggattcac ttccagtaat
tatggcatgg totgggtccg ccaggctcca aagaagggtc tggagtgggt
cgcatatatt gattctgatg gtgataatac ttactaccga gattccgtga
agggccgatt cactatctcc agaaataatg caaaaagcac cctatatittg
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaac
agggattgtc cggcccttcc tctattgggg ccaaggaacc acggtcacgc
tctcg

FIGURA 1B

Región V de 1519 gL20 SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFKPGKAPK
RLIYLVSTLD SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP
HTFGQGTKLE IK

Región V de 1519 gL20 (expresión en *E.coli*) SEQ ID NO: 16

gatataccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgccca gcgtaggcga
tcgtgtgact attacctgta aaagctccca gtccctgggtg ggtgcaagcg
gcaaaaacctt cctgtactgg ctctttccaga aacggggcaa agctccgaaa
cgctgatct atctgggtgtc taccctggat agcggtattc cgtctcggtt
ctccggtagc ggtagcggtg ccgaattcac gctgaccatt agctccctcc
agccggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg
cacactttcg gccaggggtac caaactggaa atcaaa

Región V de 1519 gL20 (expresión en mamíferos) SEQ ID NO: 17

gatataccaga tgacccagag cccatctagc ttatccgctt ccgttggtga
tcgcgtgaca attacgtgta agagctccca atctctcggtg ggtgcaagtg
gcaagaacctt tctgtactgg ctctttccaga agcctggcaa ggcaccaaaa
cgctgatct atctgggtgtc taccctggac totgggatac cgtcacgatt
ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt tcctcgctgc
aacccgagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac tcattttccg
cacactttcg gccaggggtac aaaactcgaa atcaaa

Región V de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en *E. coli*)

SEQ

ID NO: 18

*MKKTALAI**AV* *ALAGFATVAQ* *ADIQMTQSPS* *SLSASVGDRV* *TITCKSSQSL*
VGASGKTYLY *WLFQKPGKAP* *KRLIYLVSTL* *DSGIPSRFSG* *SGSGTEFTLT*
ISSLQPEDFA *YYCLQGTHF* *PHTFGQGTKL* *EIK*

Región V de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en *E. coli*)

SEQ

ID NO: 19

atgaaaaaga *cagctatcgc* *aattgcagtg* *gccttgggtg* *gtttcgctac*
cgtagcgcaa *gctgatatcc* *agatgaccca* *gagtccaagc* *agtctctccg*
ccagcgtagg *cgatcgtgtg* *actattacct* *gtaaaagctc* *ccagtccttg*
gtgggtgcaa *ggggcaaaac* *ctacctgtac* *tggctcttcc* *agaaaccggg*
caaagctccg *aaacgcctga* *tctatctggg* *gtctaccctg* *gatagcggta*
ttccgtctcg *tttctccggg* *agcggtagcg* *gtaccgaatt* *caogctgacc*
attagctccc *tccagccgga* *ggactttget* *acctattact* *gcctccaggg*
cactcathtt *ccgcacactt* *tcgggcaggg* *taccaaaactg* *gaaatcaaa*

FIGURA 1C

Región V de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos)

SEQ ID NO: 20

MSVPTQVLGL *LLLWLT*DARC DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCKSSQSLV
GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI
SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP HTFGQGKLE IK

Región V de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos)

SEQ ID NO: 21

atgtctgtcc *ccacccaagt* *cctcggactc* *ctgctactct* *ggcttacaga*
tgccagatgc gatatccaga tgaccagag cccatctagc ttatccgctt
ccgttggtga tcgctgaca attacgtgta agagctccca atctctcgtg
ggcgcaagtg gcaagaccta tctgtactgg ctctttccaga agcctggcaa
ggcaccacaaa cggctgatct atctgggtgtc tacccttgac tctgggatac
cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt
tcctcgtctc aaccagagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac
tcatttccct cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaa

Cadena ligera de 1519 gL20 (V+ constante) SEQ ID NO: 22

DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK
RLIYLVSTLD SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP
HTFGQGKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSIYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNREGC

Cadena ligera de 1519 gL20 (V+ constante, expresión en *E. coli*) SEQ ID NO: 23

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga
tcgtgtgact attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg
gcaaaaaccta cctgtactgg ctctttccaga aaccgggcaa agctccgaaa
cgccctgatct atctgggtgtc taccctggat agcgggtattc cgtctcgttt
ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaaccatt agctccctcc
agcaggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcgc tcatttttcg
cacactttcg gccaggggac caaactggaa atcaaacgta cggtagcggc
cccatctgtc ttcatcttcc cgcctctgta tgagcagltg aaatctggaa
ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa
gtacagtggg aggtggataa cgcctcccaa tcgggtaact cccaggagag
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc
tgacgctgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgcctgcgaa
gtcaccctcc agggcctgag ctaccagta acaaaaagtt ttaatatagagg ggagtgt

FIGURA 1D

Cadena ligera de 1519 gL20 (V+ constante, expresión en mamíferos) SEQ ID NO: 24

```

gatataccaga tgaaccagag tccaagcagt ctctccggca gggtagggca
tcgtgtgaat attacctgta aaagctccca gtccctgggtg ggtgcaagcg
gcaaaaacctt cctgtactgg ctcttccaga aaccggggcaa agctccgaaa
cgctgatct atctgggtgtc tacctggat agcgggtattc cgtctcgttt
ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt agctccctcc
agccggagga ctttgctacc tattactgcc tcagggcac tcattttccg
cacactttcg gccagggtac caaactggaa atcaaacgta cggtagcggc
cccatctgtc ttcactcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa
ctgctctgtg tgtgtgcctg ctgaataaact totatccag agaggccaaa
gtacagtga aggtggataa cggcctccaa tcgggtaact ccagggagag
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc
tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgogaa
gtcaccctac agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt

```

Cadena ligera de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en *E. coli*)

SEQ ID NO: 25

```

MKKFAIAIAV ALAGFATVAQ ADIQMTQSPS SLSASVGDHV TITCRSSQSL
VGASGKTYLY WLFQKFGKAP KRLIYLVSTL DSGIESRPSG SGSGTEFTLT
ISSLQPEDFA TYYCLQGTFF PHTFGQGTKL EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ
LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSSTYS
LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

```

Cadena ligera de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en *E. coli*)

SEQ ID NO: 26

```

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
cgtagcgcaa gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg
ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtaaaagctc ccagtccttg
gtgggtgcaa gggcaaaaac ctacctgtac tggctcttcc agaaaccggg
caaagctccg aaacgcctga tctatctggg gtctaccctg gatagcggta
ttccgtctcg tttctccggc agcggtagcg gtaccgaatt cagcctgacc
attagctccc tcagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg
cactcatttt ccgcacactt tcggccaggg taccaaaactg gaaatcaaac
gtacggtagc ggcccatct gtcttcatct tccgcctc tgatgagcag
ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acctctatcc
cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgcctc caatcgggta
actccagga gagtgtoaca gagcaggaca gcaaggacag caoctacago
ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt
ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcacca gtaacaaaaa
gttttaaatag aggggagtg

```

FIGURA 1E

Cadena ligera de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos)
SEQ ID NO: 27

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT TCKSSQSLV
GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI
SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP HTFGQGKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSYSL
SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSPV TKSFNRGEC

Cadena ligera de 1519 gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos)
SEQ ID NO: 28

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgtactct ggcttacaga
tgccagatgc gatatccaga tgacccagag cccatctagc ttatccgctt
ccgttgggtga tcgcgtgaca attacgtgta agagctccca atctctcgtg
ggtgcaagtg gcaagaccta tctgtactgg ctctttcaga agcctggcaa
ggcaccacaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac tctgggatac
cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt
tcctcgtctgc aacccgagga ctttgcctacc tactactgoc tgcaaggcac
tcattttccct cacaacttctg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta
cggtagcggc cccatctgtc ttcactctcc cggcatctga tgagcagttg
aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cggcctccaa tggggtaact
cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
cgcttgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct
tcaacagggg agagtgt

Región V de 1519 gH20 SEQ ID NO: 29

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY
IDSDGDNTYY RDSVKGRFTI SRDPAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI
VRPFLYWQQG TLVTVS

Región V de 1519 gH20 (expresión en *E. coli*) SEQ ID NO: 30

gaggttccgc tggtcagatc tggaggcggg cttgtccago ctggagggag
cctgggtctc tcttgtgcag tatctggctt cacttctcc aactacggta
tgggtgtgggt tcgtcagget ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat
attgactccg acggcgacaa cactactat cgcgactctg tgaaaggctg
cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac ctgoagatga
acagcctgag tgotgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcctc
gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggg accctcgta ctgtctcg

FIGURA 1F (secuencias señal subrayadas y en cursiva)

Región V de 1519 gH20 (expresión en mamíferos) SEQ ID NO: 31

gaggtaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag
 tttaagtcctc tcttgtgctg tgtctggctt cactctctcc aattacggaa
 tggctctgggt cagacaagca cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat
 attgactctg acggggacaa caactactat cgggattccg tgaaaggacg
 ctccacaatc tcccgagata acgccaagag ctcaactgtac ctgcagatga
 atagcctgag agccgaggat actgcccgtgt actattgcac aacgggaatc
 gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttgggtta ctgtctcg

Región V de 1519 gH20 (expresión en *E. coli*) SEQ ID NO: 32

MKKTATATAV ALAGFATVAQ AEVLVESGG GLVQPGGSLR LSCAVSGFTF
 SNYGMVWVRQ AFGKGLEWVA YIDSDGNTY YRDSVKGRFT ISRDNAKSSL
 YLQMNSLRAE DTAVYYCTTG IVRPFLYWGQ GTLVTVS

Región V de 1519 gH20 (expresión en *E. coli*) SEQ ID NO: 33

atgagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
cgtggcgcaa gctgaggttc cgctggtcga gtctggaggc gggcttgctc
 agcctggagg gagcctgogt ctctcttctg cagtatctgg ctccacgttc
 tccaactacg gtatggtgtg ggttcgtcag gctccaggta aaggtctgga
 atgggtggcg tatattgaat ccgacggcga caacacctac tatcgcgact
 ctgtgaaagg togtttcacc atttcccgcg ataacgcaa atccagcctg
 tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcgg tgtactattg
 caccactggc atcgtgcgtc cgtttctgta ttggggtcag ggtaccctcg
 ttactgtctc g

Región V de 1519 gH20 (expresión en mamíferos) SEQ ID NO: 34

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSE VPLVESGGGL VQPGGSLRLS CAVSGFTFSN
 YGMVWVRQAP GKGLEWVAYI DSDGNTYYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL
 QMNSLRAEDT AVYYCTTGIV RPFYWGQGT LVTVS

Región V de 1519 gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos)

SEQ ID NO: 35

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctgag gtaccacttg tggaaagcgg aggaggtctt gtgcagcctg
 gaggaagttt acgtctctct tgtgctgtgt ctggcttcac cttctccaat
 tacggaatgg tctgggtcag acaagcaact ggaaagggtc ttgaatgggt
 ggctatatatt gactctgacg gggacaacac ctactatcgg gattccgtga
 aaggacgctt cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
 cagatgaata gcttgagagc cgaggatact gccgtgtact attgcacaac
 gggaatogtt aggccttttc tgtactgggg acagggcacc ttggttactg tctcg

FIGURA 1G

Cadena pesada de Fab' de 1519gH20 (V+ CH1 de gamma 1 humana + bisagra) SEQ ID NO: 36

```
EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY
IDSDGDNTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI
VRPFLYWQGG TLVTVSSAST KGFSVFPLAF SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
PEPVTFSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVFPS SSLGTQTYIC
NVNHKPSNEK VDKKVEPKSC DKTHTCAA
```

Cadena pesada de Fab' de 1519gH20 (V+ CH1 de gamma 1 humana + bisagra, expresión en *E. coli*) SEQ ID NO: 37

```
gagggtaccgc tgggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggagag
cctgggtcttc tcttgtgcag tatctggctt cacttcttc aactacggta
tgggtctgggt tgcgcaggct ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat
attgactccg acggcgacaa cacotactat cgcgactctg tgaaaggctg
cttcaccatt tcccgagata acgcaaaato cagcctgtac ctgcagatga
acagcctgcg tgctgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcctc
gtgggtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgta ctgtctcgag
cgcttctaca aaggggccat cggctctccc cctggcacc cctctcaaga
gcacctcttg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc
cccgaaacgg tgacgggtgt gtggaactca ggcgcctga ccagcggcgt
gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca
gggtggtgac cgtgcctctc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtgcacaaga aagttgagcc
caaatcttgt gacaaaacto acacatgcgc cgcg
```

Cadena pesada de Fab' de 1519gH20 (V+ CH1 de gamma 1 humana + bisagra, expresión en mamíferos) SEQ ID NO: 38

```
gagggtaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggagggaag
tttacgtctc tcttgtgtcg tgtctggctt cacttcttc aattacggaa
tgggtctgggt cagacaagca cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcgtat
attgactctg acggggacaa cacotactat cgggattcog tgaaaggagc
cttcacaatc tcccgagata acgccaagag ctactgtac ctgcagatga
atagcctgag agccgaggat actgcggtgt actattgcac aacgggaato
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accctggta ctgtctcgag
cgcttctaca aaggggccat cggctctccc cctggcacc cctctcaaga
gcacctcttg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc
cccgaaacgg tgacgggtgt gtggaactca ggcgcctga ccagcggcgt
gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca
gggtggtgac cgtgcctctc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtgcacaaga aagttgagcc
caaatcttgt gacaaaacto acacatgcgc cgcg
```

FIGURA 1H

Cadena pesada de Fab' de 1519 gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en *E. coli*) SEQ ID NO: 39

*MKKTALAI**AV* *ALAGFATVAQ* *AEVPLVESGG GLVQPGGSLR LSCAVSGFTF*
SNYGMVWVRQ *APGKGLEWVA YIDSDGDNTY YRDSVKGRFT ISRDNAKSSL*
YLQMNSLRAE *DTAVYYCTTG IVRPFLYWGG GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA*
PSSKSTSGGT *AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL*
YSLSSVVTVP *SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKHTTCAA*

Cadena pesada de Fab' de 1519 gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en *E. coli*) SEQ ID NO: 40

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
ogtggcgcaa gctgaggttc cgctggtoga gtctggagggc gggcttgctc
agcctggagg gacgctgctg ctctcttggtg cagtatctgg cttoacgttc
tccaactacg gtatgggtgtg ggttcgctcag gctccaggta aaggtctgga
atgggtggcg tatattgact cggacggcga caacacctac tatcgcgact
ctgtgaaagg tgccttcacc atttcccgcg ataacgcca atccagcctg
tacctgcaga tgaacagcct gcggtgctgaa gatactgcgg tgtactattg
caccactgge atcgtgcgtc cgtttctgta ttgggggtcag ggtacctctg
ttactgtctc gagcgcttct acaaaggggc cctcggtctt ccccttgga
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca ggggccttg gctgcctggg
caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac tcaggcgccc
tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc
tactcctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca
gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca
agaaagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cgcgcgcg

Cadena pesada de Fab' de 1519 gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos) SEQ ID NO: 41

MEWSVFLFF LSVTTGVHSE *VPLVESGGGL VQPGGSLRLS CAVSGFTFSN*
YGMVWVRQAP *GKGLEWVAYI DSDGDNTYYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL*
QMNSLRAEDT *AVYYCTTGIV RPFLYWGGGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS*
SKSTSGGTAA *LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS*
LSSVVTVPSS *SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KHTTCAA*

FIGURA 11

Cadena pesada de Fab' de 1519 gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos) SEQ ID NO: 42

atggaatgga gctgggtctt totcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctgag gtaccacttg tggaaagcgg aggaggctctt gtgcagcctg
 gaggaagttt acgtctctct tgtgctgtgt ctggcttcac cttctccaat
 tacggaatgg totgggtcag acaagcaoct ggaaagggtc ttgaatgggt
 ggccatatatt gactctgacg gggacaacac ctactatcgg gattccgtga
 aaggacgctt cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
 cagatgaata gcttgagagc cgaggatact gccgtgtact attgcacaac
 gggaaatcgtt aggccttttc tgtactgggg acagggcacc ttggttactg
 tctcgagcgc ttctacaaag ggcccacatcg tcttccccct ggcaccctcc
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga
 ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca
 gggcgctgca caccttcccg gctgtcctac agtctcagg actctactcc
 ctcagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc
 catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtc gacaagaaag
 ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcgcgcg g

Cadena pesada de IgG4 de 1519gH20 (V+ constante de gamma 4P humana) SEQ ID NO: 43

EVPLVESGGG LVQPGSSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY
 IDSDGDNYY RDSVKGRFTI SRDNAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI
 VRPFYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFELAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTGPS SSLGKTYTC
 NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
 SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
 FFELYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

FIGURA 1JCadena pesada de IgG4 de 1519₂H20 (V + constante de gamma 4P humana, exones subrayados)

SEQ ID

NO: 44

gaggtaccac ttgtggaaaag cggaggagggt cttgtgcagc ctggaggaaag
 tttacgtctc tcttgtgctg tgtctggcctt cactctctcc aattacggaa
 tggctctgggt cagacaagca cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat
 attgactctg aoggggacaa cactactat cgggattccg tgaaggagc
 cttcacaatc tcccgagata acgccaagag ctcaactgtac ctgcagatga
 atagcctgag agccgaggat actgcctgtt actattgcac aacgggaatc
 gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag
 cgcttctaca aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgcctcagga
 gcacctccga gaggacagcc gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc
 ccogaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca ggcgcctga ccagcggcgt
 gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctcc aggaactctac tccctcagca
 gcgtggtgac cgtgcctccc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc
 aaagttagatc acaagccag caacaccaag gtggacaaga gagttggtga
 gaggccagca caggaggga ggtgtctgc tggaaagccag gctcagccct
 cctgcctgga cgcaccccgg ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc
 atgcccacac tgtctctca ccggaggcc tctgaccacc ccactcatgc
 ccaggagag ggtctcttg atttttccac caggctccgg gcagccacag
 gctggatgcc cctaccccag gccctggcca tacaggggca ggtgtctgac
 tcagacctgc caagagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaaag
 ccaccccaaa ggcacaaact tccactccct cagctcagac acctctctc
 ctcccagatc tgagtaactc ccaatctctt ctctgcagag tccaaatatg
 gtcctccatg ccacccatgc ccaggtaagc caaccagggc ctgcctctcc
 agctcaaggc gggacagggt ccttagagta gcctgcctcc agggacaggg
 cccagccggg tgcctgaagca tccacctcca tctcttctcc agcactgag
 ttcttggggg gaccatcagt ctctctgttc cccccaaaac ccaaggacac
 tctcatgac tcccgaccc ctgagggtcc gtgcgtgggt gtggacgtga
 gccagggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gacagttca acagcacgta
 ccgtgtgggt agcgtctca ccgtctctga ccaggactgg ctgaacggca
 aggagtacaa gtgcaaggtc tccaaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag
 aaaaccatct ccaagacaaa aggtgggacc cccgggggtgc gagggccaca
 tggacagagg tcagctcggc ccacccctct cctggggagt gaccgctgtg
 ccaacotctg tccctacagg gcagcccga gagccacagg tctacaccc
 gcccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc
 tggtaaaaag cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga
 cggctctctc tctctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc
 aggaggggaa tctctctca tgcctcgtga tgcctgaggg tctgcacaa
 cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggtaaa

FIGURA 1K

Cadena pesada de IgG4 de 1519gH20 (V+ constante de gamma 4P humana) con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 45

atggaatgga gctgggtctt totcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctgag gtaccacttg tggaaagcgg aggaggtctt gtgcagcctg
gaggaagttt acgtctctct tgtgctgtgt ctggcttcac cttctccaat
tacggaatgg totgggtcag acaagcacc ctgaaagggtc ttgaatgggt
ggcctatatt gactctgacg gggacaacac ctactatcgg gattccgtga
aaggacgctt cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
cagatgaata gctcagagcg cgaggatact gcctgtgact attgcacaac
gggaatcggt aggccttttc tgtactgggg acagggcacc ttgggttactg
tctcagagcg ttctacaaag ggcctatccg tcttccctct ggcgccctgc
tccaggagca cctccgagag cacagccgco ctggggtgco tggtaaggga
ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca
ggggcgtgca cacttccccg gctgtctctac agtctcagg actctactcc
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cgaagacctt
cactgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag
ttgggtgagag gccagcacag ggaggggagg tgtotgctgg aagccaggct
cagccctctt gctcggacgc accccggctg tgcagcccc gccagggca
gcaaggcatg ccccatctgt ctctcacc ccagggcctct gaaccacca
ctcatgcca gggagagggc cttctggatt ttccaccag gctccgggca
gccacaggct ggalgccct accccaggco ctggcgcatac aggggcagg
gctgcgtca gaactgccaa gagccatata cgggaggacc ctgccctga
cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc actccctcag ctacagacc
ttctctcttc ccagatctga gtaactccca atcttctctc tgcagagtcc
aaatatggto ccccatgccc accatgccca ggtaagccaa cccagcctc
gccctccagc tcaaggcggg acagggtgcc tagagttagc tgcctccagg
gacaggcccc agccgggtgc tgacgcctcc acctccatct cttctcagc
acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc ccaaaacca
aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcaggtg cgtgggtggtg
gacgtgagcc aggaagacc cgaggctccag ttcaactggt acgtggatgg
cgtggagggt cataatgcc agacaaaggc gggggaggag cagttcaaca
gcacgtaccg tgtgggtcagc gtctcaccg tcttgacca ggaactggctg
aacggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaaggcc tccgtctctc
catcgagaaa aocatctcca aagocaaagg tgggaccac ggggtgogag
ggccacatgg acagaggtca gctgggccca cctctgccc tgggagtga
cgtgtgcca acctctgtcc ctacagggca gcccagagag ccacagggtg
acacctgccc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg
acctgctgtg tcaaggctt ctaccccagc gacatgcgc tggagtggga
gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg
actccgaagg ctcttctctc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc
aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct
gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaa

FIGURA 1L

Cadena ligera de FabFv de 1519gI20 SEQ ID NO: 46

```

DIQMTQSFSS LSASVGDRVT ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK
RLIYLVSTLD SGIPSRFSGS GSGTEFTLEI SSLQPEDFAT YYCLOGTHFP
HTFCQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGECS GGGGSGGGGS GGGGSDIQMT QSPSSVSASV
GDRVTITCQS SPSVWSNFLS WYQQKPGKAP KLLIYEASKL TSGVPSRFSG
SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA TYICGGGYSS ISDTTFCGCT KVEIKRT

```

Cadena ligera de FabFv de 1519gI20 SEQ ID NO: 47

```

gatatacaga tgacccagag cccatctagc ttatccgctt cggttggtga
tcgcgtgaca attacgtgta agagctacca atctctcgtg ggtgcaagtg
gcaagaccta tctgtactgg ctctttcaga agcctggcaa ggcacaaaaa
cggtcgatct atctggtgtc tacccttgac tctgggatac cgtcacgatt
ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt tcatcgctgc
aacccgagga ctttgcctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttccct
cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta cggtagcggc
cccatctgtc ttcactctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa
ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact totatcccag agaggccaaa
gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tgggtaact ccagggagag
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg agcagcacco
tgacgctgtc taaagcagac tacgagaaac acaaagtgtg cgctgcgaa
gtcacccatc agggcctgag ctacaccagta acaaaaagtt ttaatatagag
ggagtgtagc ggtggcgggtg gcagtgggtg gggaggctcc ggagggtggc
gttcagacat acaaatgacc cagagtcctt catcggtatc cgcgtccggt
ggcgataggg tgactattac atgtcaaagc tctcctagcg tctggagcaa
ttttctatcc tggatcaac agaaaccggg gaaggctcca aaacttctga
tttatgaagc ctcgaaactc accagtggag ttccgtcaag attcagtggc
tctggatcag ggacagaact caogttgaca atcagttcgc tgcaaccaga
ggactttgcg acctactatt gtggtggagg ttacagtagc ataagtgata
cgacatttgg gtgcggtact aaggtggaaa tcaaacgtac c

```

Cadena ligera de FabFv de 1519gI20 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 48

```

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKSSQSLV
GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD SGIPSRFSGS GSGTEFTLEI
SSLQPEDFAT YYCLOGTHFP HTFCQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL
SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGECS GGGGSGGGGS
GGGGSDIQMT QSPSSVSASV GDRVTITCQS SPSVWSNFLS WYQQKPGKAP
KLLIYEASKL TSGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA TYICGGGYSS
ISDTTFCGCT KVEIKRT

```

FIGURA 1M

Cadena ligera de FabFv de 1519gL20 con secuencia señal subrayada y en cursiva

SEQ ID NO:

49

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggaactc ctgctactct ggcttacaga
tgccagatgc gatatccaga tgaccagag cccatctagc ttatccgctt
 ccgttggtga tcgctgaca attacgtgta agagctccca atctctcgtg
 ggtgcaagtg gcaagacctt totgtactgg ctctttcaga agcctggcaa
 ggcacaaaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac totgggatac
 cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt
 tcatcgctgc aacccgagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac
 tcattttccct cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta
 cggtagcggc cccatctgtc ttcattcttc cgcctctga tgagcagttg
 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
 agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccttccaa tcgggtaact
 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg
 agcagcaccc tgacgctgtc taaagcagac tacgagaaac acaagtgta
 cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctccaccagta acaaaaagtt
 ttaatagagg ggagtgtagc ggtggcgggt gcagtgggtg gggaggctcc
 ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc cagagtcctt catcggtatc
 cgcgtccggt ggcgataggg tgactattac atgtcaaagc tctcctagcg
 tctggagcaa ttttctatcc tggatcaac agaaacgggg gaaggctcca
 aaactttotga tttatgaagc ctogaaactc accagtggag ttccgtcaag
 attcagtggc tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc
 tgcaaccaga ggaactttgcg acctactatt gtggtggagg ttacagtagc
 ataagtgata cgacatttgg gtgcggtact aaggtggaaa tcaaacgtac
 c

Cadena pesada de FabFv de 1519gH20 SEQ ID NO: 50

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY
 IDSDDGNTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI
 VRPFYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC SGGGGSGGGG TGGGGSEVQL LESGGGLVQP
 GGSRLRLSCAV SGIDLSNYAI NWVRQAPGKC LEWIGIIWAS GTTFYATWAK
 GRFTISRDNK KNTFVYLQMNS LRAEDTAVYY CARTVPGYST APYFDLWGQG TLVTVSS

FIGURA 1N

Cadena pesada de FabFv de 1519gH20 SEQ ID NO: 51

```

gaggtaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggagggaag
tttaacgtctc tottgtgctg tgtctggctt caccttctcc aattacggaa
tggtctgggt cagacaagca cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat
attgactctg acgggggacaa cacctactat cgggattccg tgaaagggaag
cttcacaatc tcccgagata acgccaagag ctactgtac ctgcagatga
atagcctgag agccgaggat actgcctgtt actattgcac aacgggaatc
gttaggctct ttctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag
cgcgtccaca aaggggccat cggctctccc cctggcaccg tcttccaaga
gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc
cccgaaccag tgacgggtgtc gtggaactca ggtgccctga ccagcggcgt
tcacaccttc cgggctgtcc tacagtcttc aggactctac tccctgagca
gogtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtcgataaga aagttgagcc
caaatcttgt agtggagggt ggggctcagg tggaggcggg accggtggag
gtggcagcga ggttcaactg cttgagctct gaggaggcct agtccagcct
ggaggggagc tgcgtctctc ttgtgcagta agcggcatcg acctgagcaa
ttaogccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt ttagaatgga
tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgtac atgggogaaa
ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca
aatgaactcc ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgctcgca
ctgtcccagg ttatagcact gcacctact tcgatctgtg gggacaaggg
acctggtga ctgtttcaag t

```

Cadena pesada de FabFv de 1519gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva

SEQ ID NO:

52

```

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSE VPLVESGGGL VQPGGSLRLS CAVSGFTFSN
YGMVWVRQAP GKGLEWVAYI DSDGDNITYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL
QMNSLRAEDT AVYYCTTGIV RPFYWGQGT LTVSSASTK GPSVFPLAPS
SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS
LSSVTVTPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKEVEPKSCS GGGGSGGGGT
GGGGSEVQLL ESGGGLVQPG GSERLSCAVS GIDLSNYAIN WVRQAPGKCL
EWIGLIWASG TTFYATWARG RPTISRDNK NTVYLQMNSL RAEDTAVYYC
ARTVPGYSTA PYFDLWGQGT LTVSS

```

FIGURA 1P

Cadena pesada de FabFv de 1519gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 53

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctgag gtaccacttg tggaaagcgg aggaggtctt gtgcagcctg
 gaggaagttt acgtctctct tgtgctgtgt ctggcttcac cttctccaat
 taaggaaatgg tctgggtcag acaagcacct ggaaagggtc ttgaatgggt
 ggcctatatatt gaactctgacg gggacaacac ctactatcgg gatcccgta
 aaggaaagott cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
 cagatgaata gcctgagagc cgaggatact gccgtgtact attgcacaac
 gggaaatcggt aggccttttc tgtactgggg acagggcacc ttggttactg
 tctcgagcgc gtccacaaaag ggcccatcgg tcttcccccct ggcaccctcc
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga
 ctacttcccc gaaccagtga cgggtgtcgtg gaactcaggt gccctgacca
 gggcgcttca cacttccccg gctgtcctac agtcttcagg actctactcc
 ctgagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta
 catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtc gataagaaaag
 ttgagcccaa atcttgtagt ggaggtgggg gctcaggtgg aggcgggacc
 ggtggaggtg gcagcgaggt tcaactgctt gagtctggag gaggcctagt
 ccagcctgga gggagcctgc gtctctcttg tgcagtaagc ggcctcgacc
 tgagcaatta cgccatcaac tgggtgagac aagctccggg gaagtgttta
 gaatggatcg gtataatatg ggccagtggg acgacctttt atgctacatg
 ggcgaaagga aggtttacaa ttagccggga caatagcaaa aacaccgtgt
 atctccaaat gaactccttg cgagcagagg acacggcggt gtactattgt
 gctcgcaactg tcccagggtta tagcaactgca cctacttctg atctgtgggg
 acaagggacc ctggtgactg tttcaagt

Marco aceptor de VK1 2-1-(1) A30 JK2 humana SEQ ID NO: 54

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NDLGWYQQKP GKAPKRLIYA
 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HNSYPYTFGQ GTKLEIK

Marco aceptor de VK1 2-1-(1) A30 JK2 humana SEQ ID NO: 55

gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
 cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag
 gctgggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct
 gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc
 tgggacagaa ttcactotca caatcagcag cctgcagcct gaagattttg
 caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccttacac ttttggccag
 gggaccaagc tggagatcaa a

FIGURA 1Q

Marco aceptor de VH3 1-3 3-07 JH4 humana SEQ ID NO: 56

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA FKGLEWVAN
IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARYF
DYWGQGTLVT VS

Marco aceptor de VH3 1-3 3-07 JH4 humana SEQ ID NO: 57

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttgggtccagc ctgggggggtc
cctgagactc tctgtgtcag cctctggatt cacctttagt agctattgga
tgagctgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac
ataaagcaag atggaagtga gaaatactat gtggactctg tgaagggcgc
attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat ctgcaaatga
acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagatacttt
gactactggg gccagggaac cctggtcacc gtctcc

Región VL del Ac 1548 de Rata SEQ ID NO: 58

DVVMTQTPLS LSVALGQPAS ISCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQRSQSPK
RLIYLVSTLD SGIEDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLGV YYCLQGTHFP
HTFGAGTKLE IK

Región VL del Ac 1548 de Rata SEQ ID NO: 59

gatgttgtga tgacccagac tccactgtct ttgtcggttg ccttggaca
accagcctcc atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtg
gaaagacata tttgtattgg ttatttcaga ggtccggcca gtctocaaag
cgactaatct atctggtgtc cacactggac tctggaattc ctgataggtt
cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc cgcagagtgg
aagccgatga tttgggagtt tattactgtc tgcaaggtag acattttcct
cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ataaaa

Región VH del Ac 1548 de Rata SEQ ID NO: 60

EVPLVESGGG SVQPGGRSMKL SCVVSGFTFS NYGMVWVRQA FKGLEWVAY
IDSDGDNTYY RDSVKGRFTI SRNNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCTGI
VRPFLYWGGG VMVTVS

FIGURA 1R

Región VH del Ac 1548 de Rata SEQ ID NO: 61

```
gaggtgccgc tgggtggagtc tggggggcggc tcagtgcagc ctggggaggtc
catgaaaactc tctgtgtgtag tctcaggatt cactttcagt aattatggca
tgggtctgggt ccgccaggct ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat
attgattctg atgggtgataa tacttactac cgagattccg tgaagggcgc
attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat ttgcaaatgg
acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt
gtccggccct ttctctattg gggccaagga gtcattggtc cagtctcg
```

Región VL del Ac 1644 de Rata SEQ ID NO: 62

```
DVVMTQTFLS LSVAIGQPAS ISCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQRSGQSPK
RLIYLVSTLD SGIPDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLGV YYCLQCTHFP
HTFGAGTKLE LK
```

Región VL del Ac 1644 de Rata SEQ ID NO: 63

```
gatgttgtga tgacccagac tccactgtct ttgtcgggtg ccattggaca
accagccctcc atctcttgca agtcaagtcg gagcotcgta ggtgctagtg
gaaagacata tttgtatttg ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag
cgactaatct atctgggtgc cacaactggac tctggaattc ctgatagggt
cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc ccagagtggt
aagccgatga tttgggaggt tattactgtc tgcaaggtae acattttctc
cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ctgaaa
```

Región VH del Ac 1644 de Rata SEQ ID NO: 64

```
EVFLVESGGG SVQFGRSTKL SCVVSGFIFS NYGMVWVRQA PKKGLEWVAY
IGSDGDNIYY RDSVKGRFTI SRNNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCTTGI
VRFFLYWGQG TTVTVS
```

Región VH del Ac 1644 de Rata SEQ ID NO: 65

```
gaggtgccgc tgggtggagtc tggggggcggc tcagtgcagc ctggggaggtc
cacgaaaactc tctgtgtgtag tctcaggatt cactttcagt aactatggca
tgggtctgggt ccgccaggct ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat
attggttctg atgggtgataa tatttactac cgagattccg tgaagggctg
attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat ttgcaaatgg
acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt
gtccggccct ttctctactg gggccaagga accacgggtc ccgtctcg
```

Figura 1S

Región VK del Ac 1496 de Rata SEQ ID NO: 66

DVVMTQTPLS LSVALGQPAS ISCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQSRSGQSPK
 RLIYLVSTLD SGIFDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLGV YYCLOGTHFP
 HTFGAGTKLE LK

Región VK del Ac 1496 de Rata SEQ ID NO: 67

gatgtttgtga tgacccagac tccactgtct ttgtcgggtg cccttggaca
 accagcctcc atctcttgca agtcaagtca gagcctogta ggtgctagtg
 gaaagacata tttgtattgg ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag
 cgactaatct atctgggtgc cacactggac tctggaattc ctgatagggt
 cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc cgcagagtgg
 aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtae acattttcct
 cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ctgaaa

Región VH del Ac 1496 de Rata SEQ ID NO: 68

EVLLVESGGG SVQPGRSMKL SCVVS GFTE NYGMVWVRQA PKKGLEWVAY
 IDSOGDNTYY RDSVKGRFTI SRNNAKSTLY LQMSLRSED TATYYCTTGI
 VRPFLYWGQG TMVTVS

Región VH del Ac 1496 de Rata SEQ ID NO: 69

gaggtgctgc tgggtggagtc tggggggcggc tcagtgcagc ctgggagggtc
 catgaaactc tctgtgtag tctcaggatt cactttcagt aattatggca
 tgggtctgggt ccgccaggct ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat
 attgattctg atgggtgataa tacttactac cgagattccg tgaagggccg
 attcaactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat ttgcaaatgg
 acagtctgag gtctgaggac aegggcactt attactgtac aacagggatt
 gtccggccct ttctctattg gggccaagga accatgggtc ccgtctcg

Cadena pesada de IgG1 de 1519gH20 (V + constante de gamma 1 humana) SEQ ID NO: 72

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY IDSOGDNTYY
 RDSVKGRFTI SRDNAKSSLY LQMNSLRARD TAVYYCTTGI VRPFLYWGQG TLVTSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKFSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV
 FLEPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK FREEQYNSTY
 RVVSVLTFLR QDWLNGKEYK CKVSNKALPA FIEKTISKAK GQPRFPQVYT LPFSRDELTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPEVLDS DGEFFLYSKL TVDKSRWQOG
 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

Figura 1T

Cadena pesada de IgG1 de 1519gH20 (V+ constante de gamma 1 humana, exones subrayados) SEQ ID NO: 73

gaggtaaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag tttaegtctc
tottgtgctg tgtetggott caecttctcc aattaaggaa tgggtotgggt cagacaagca
cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa caoctactat
cgggattcog tgaagggacg ctccacaatc tcccgagata acgccaagag ctcaactgtac
ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgccgtgt actatigcac aacgggaato
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag cgtctctaca
aaggggccat cgggtcttccc cctggcaacc tctcccaaga gcaectctgg gggcacagcg
gcctggggt gctgtgtcaa ggaactcttc ccggaacggg tgaagggtgc gtggaactca
ggcgccctga ccagcggggt gcacaccttc ccggctgtcc tacagctctc aggactctac
tccctcagca gctgtgtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtgcacaaga aagttggtga gaggccagca
cagggaggga ggggtgtctg tggaaagccg gctcagcgct cctgcctgga cgcctccgg
ctatgcagcc ccagtccagg gcagcaaggg agggcccgtc tgcctcttca cccggaggcc
tctgcccgcc ccactcatgc tcagggagag ggtcttctgg ctttttcccc aggtctctgg
caggeacagg ctaggtgcc ctaaccagg cctgcacac aaaggggcag gtgctgggct
cagacctgcc aagagccata tccgggagga cctgcacct gacctaacgc caccocaaag
gccaaactct ccactccctc agctcggaca ccttctctcc tcccagatct gagtaactcc
caatcttctc tctgcagagc ccaaatcttg tgacaaaaact cacacatgcc caccgtgcc
aggtaagcca gccaggcct cgcctccag ctcaaggcgg gacagggtgc cttagagtagc
ctgcatccag ggaacggccc cagccgggtg ctgacacgtc cactccatc tcttctcag
cacctgaact cctgggggga cgtcagttt tctcttctcc cccaaaaccc aaggacaccc
tcatgatctc ccggaacct gaggtcacat ggtgtgtgtt ggacgtgagc caccgaagac
ctgaggtcaa gtccaactgg taagtggacg ggtgtgaggt gcataatgcc aagacaaagc
cgggggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc
aggactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag gtgggacccc tgggggtgca gggccacatg
gacagaggcc ggctcggccc acctctgac ctgagagtga ccgctgtacc aacctctgtc
octacagggc agcccccaga accacagggtg tacacctgac ccccatcccg gcatgagctg
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaaggct totatccacg cgacatcgcc
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgtg
gactccgaag gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcg
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag
aagagcctct cctgtcttcc gggtaaa

FIGURA 1U

Cadena pesada de IgG1 de 1519gH20 (V+ constante de gamma 1 humana) con secuencia señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO: 74

atggaatgga gctgggtctt tctctctctt ctgtcagtaa ctacaggagt ccattctgag
gtaccacttg tggaaagcgg aggaggtctt gtgcagcctg gaggaagttt acgtctctct
tgtgctgtgt ctggcttcac ctctctcaat taaggaaatgg tctgggtcag acaagcact
ggaaagggtc ttgaatgggt ggcttatatt gactctgacg gggacaacac ctactatcgg
gattccgtga aaggacgtt cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
cagatgaata gcttgagagc cgaggatact gcctgttact attgcacaac gggaatcgtt
aggccttttc tctactgggg acagggcacc ttggttactg tctcgagcgc ttctacaag
ggccatcgg tcttccccct ggcacctcc tcacaagagca cctctggggg cacagcgggc
ctgggctgcc tggtaaggga ctactcccc gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc
gcctgacca ggggcgtgca caccctcccg gctgtctac agtctcagg actctactcc
ctcagcagcg tggtagcgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac
gtgaatcaca agcccagcaa cccaaggctc gacaagaaag ttggtgagag gccagcacag
ggaggaggg tctctgctgg aagccaggct cagcgtctct gccaggagc atcccggcta
tgcagcccca gtccagggca gcaaggcagg ccccgctctg ctcttcaccc ggaggcctct
gcccgcacca ctcatgctca gggagagggt ctcttggtt ttccccagg ctctgggcag
gcacaggcta ggtgcccta acccaggccc tgcacacaaa ggggcagggt ctgggctcag
acctgccaa agccatatcc gggaggacc tgcctctgac ctaagccca cccaaaggcc
aaactctcca ctccctcagc tcggacaact tctctctcc cagatctgag taactcccaa
tcttctctct gcagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccca cgtgccagg
taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgcccta gagtgcctg
catccaggga caggccccag ccgggtgtg acacgtccac ctccatctct tctcagcac
ctgaactctt ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca
tgatctcccg gacccctgag gtcacatgag tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg
aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggagggtga taatgccaa acaaagccgc
gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc ctgcaccagg
actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc ccagccccc
tcgagaaaa cctctccaaa gccaaagggt ggaccctgg ggtgcgagg ccacatggac
agaggccggc tggcccacc ctctgccctg agagtgaacg ctgtaccaac ctctgtccct
acaggggcag cccgagaacc acagggtgac accctgccc catcccgga tgagctgacc
aagaaccagg tcagctgac ctgcctggtc aaaggcttct ctccagcga catgccctg
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccagcctcc cgtgctggac
tccagcggct ccttcttct ctacagcaag ctccagctgg acaagagcag gtggcagcag
gggaacgtct tctcatgtct cgtgatgcat gaggctctg acaaccaata cagcagag
agcctctccc tctctccggtaaa

FIGURA 1V

Cadena ligera de 1519gL20 (V+ constante, expresión alternativa en mamíferos) SEQ ID NO: 75

```

gatatccaga tgaccacagag cccatcttagc ttatccgcctt ccgttgggtga
tcgcgtgaca attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagtg
gcaagacota tctgtactgg ctctttcaga agcctggcaa ggcacccaaaa
cggctgatct atctgggtgtc tacccttgac tetgggatac cgtcacgatt
ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt tcatoctgtc
aaccocagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttccct
cacactttcg gccaggggac aaaaactcgaa atcaaaacgta ccgtagcggc
cccattctgtc ttcatcttcc cgccattctga tgagcagttg aaatctggaa
ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa
gtacagtggg aggtggataa cgcctccaa tggggtaact cccaggagag
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc
tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt

```

Cadena pesada de Fab' de 1519gH20 (V+ CH1 de gamma 1 humana + bisagra, expresión en mamíferos una base cambiada de la SEQ ID NO: 38) SEQ ID NO: 76

```

gaggtaaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggagggaag
tttacgtoto tcttgtgtgtg tgtctggctt caocttctcc aattacggaa
tggtctgggt cagacaagca cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat
attgactctg acggggacaa caoctactat cgggattccg tgaaaggacg
cttcacaatc tcccgagata acgccaagag ctactgtac ctgcagatga
atagcctgag agccgaggat actgcctgtt actattgcac aaocgggaatc
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag
cgcttctaca aaggggcccat cgggtcttccc cctggcacc ccttccaaga
gcaoctctgg gggcacagcg gcoctgggtt gcctggtnaa ggaactactc
ccggaacccg tgacgggtgtc gtggaactca ggcgcctga ccagcggcgt
gcacaacttc ccgggtgttc tacagtcctc aggaactctac tccctcagca
gcgtgggtgac cgtgcctctc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc
caaatcttgt gacaaaactc acacatgcgc cgcg

```

Cadena pesada de Fab' de 1519gH20 con secuencia señal subrayada y en cursiva (expresión en mamíferos una base cambiada de la SEQ ID NO: 42) SEQ ID NO: 77

```

atgggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctgag glacnacttg tggaagcgg aggaggtctt gtgcagcctg
gaggaagttt acgtctctct tgtgtgtgt ctggcttcac cttctccaat
tacggaatgg tctgggtcag acaagcact ggaaagggtc ttgaatgggt
ggcctatatt gactctgacg gggacaacac ctactatcgg gattccgtga
aaggacgctt cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
cagatgaata gcctgagagc cgaggatact gcctgtact attgcacaac
gggaatogtt aggccttttc tgtactggg acagggcacc ttggttactg
tctogagcgc ttctacaaaag ggcccatcgg tcttccccc ggcaccctcc
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga
ctaecttccc gaacgggtga cgggtgtgtg gaactcagg gccctgacca
gcggcgtgca caocttcccg gctgtctac agtctcagg actctactcc
ctcagcagcg tggtgacctg gccctcagc agcttgggca cccagacctc
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaggtg gacaagaaag
ttgagcccaa atcttgtgac aaaaactcaca catgcgccgc g

```

Figura 1W

Cadena ligera de FabFv de 1519gL20 (secuencia alternativa a SEQ ID NO: 46) SEQ ID NO: 78

```

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK
RLIYLVSTLD SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP
HTFGQGTLKE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGECG GGGSGGGGSG GGGSDIQMTQ SPSSVSASVG
DRVTITCQSS PSVWSNFLSW YQKPGKAPK LLIYEASKLT SGVPSRFSGS
GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCGGGYSSI SDTTFGCGTK VEIKRT

```

Cadena ligera de FabFv de 1519gL20 (secuencia alternativa a SEQ ID NO: 47) SEQ ID NO: 79

```

gacatccaga tgacceagtc cccctccagc ctgtccgcct ccgtggggcga
cagagtgacc atcacatgca agtcctccca gtccctggtc ggagcctcog
gcaagaccta cctgtactgg ctgttccaga agcccgga aa gcccccaag
cggctgatct acctgggtgtc taccctggac tccggcatcc cctcccggtt
ctccggctct ggctctggca ccgagttcac cctgaccatc tccagcctgc
agcccgagga ctccgccacc tactactgtc tgcaaggeac ccacttcccc
cacaccttcg gccagggcac caagctggaa atcaagcgga ccgtagcggc
cccatctgtc ttcactttcc cgcctctga tgagcagttg aaatctggaa
ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa
gtacagtggg aggtggataa cgcctccaa tggggttaact ccaggagag
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc
tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa
gtcacccatc agggcctgag ctccgccgtc acaaagagct tcaacagggg
agagtgtggg ggaggtggct ctggcggtgg tggctccgga ggcgaggaa
gcgacatcca gatgaccag agcccttct ctgtaagcgc cagtgtcgga
gacagagtga ctattacctg ccaaagctcc ccttcagttt ggtccaattt
tctatcctgg tatcagcaaa agcccgga aa ggtcctaaa ttgctgatct
acgaagcaag caaactcacc agcgcggtgc ccagcaggtt cagcggcagt
gggtctggaa ctgactttac cctgacaatc tctcactcc agcccgagga
cttcgccacc tattactgcy gtggaggtta cagtagcata agtgatacga
catttggtat cggcactaaa gtggaaatca agcgtacc

```

FIGURA IX

Cadena pesada de FabFv de 1519gH20 (secuencia alternativa a SEQ ID NO: 51) SEQ ID NO: 80

```

gaggtgcccc tgggtggaatc tggcgggcgga ctggtgcagc ctggcggctc
cctgagactg tcttgccgcg tgtccggctt cactttctcc aactacggca
tgggtctgggt ccgacaggct cctggcaagg gactggaatg ggtggcctac
atcgactccg acggcgacaa cacctactac cgggactccg tgaagggccg
gttcaccatc tcccgggaca acgccaagtc ctccctgtac ctgcagatga
actccctgcg ggccgaggac accgcccgtgt actactgcac caccggcatc
gtgcggccct ttctgtactg gggccagggc accctgggtca cagtgtcctc
tgctttctaca aaggggccat cgggtcttccc cctggcaccc tctccaaaga
gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctggteaa ggactacttc
ccgaaccggg tgacgggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt
gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc tggactctac tccctcagca
gcgtgggtgac cgtgcccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc
caaatcttgt tccggagggt gcggttccgg aggtggcgggt acaggtggcg
gtgggtccga agtccagctg cttgaatccg gaggcggact cgtgcagccc
ggaggcagtc ttcgottgtc ctgcgctgta totggaatcg acctgagcaa
ttaogccatc aactgggtga gacaggcacc tgggaaatgc ctogaatgga
tcggcattat atgggctagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaag
ggtagattca caatctcacg ggataatagt aagaacacag tgtacctgca
gatgaactcc ctgcgagcag aggataccgc cgtttactat tctgctcgca
ctgtcccagg ttatagcact gcaccctact ttgatctgtg ggggcagggc
actctggtea ccgtctcgtc c

```

Figura 1Y (secuencias señal subrayadas y en cursiva)

Región VL del Ac 1548 de Rata (secuencia alternativa a SEQ ID NO: 58) SEQ ID NO: 81

DVVMTQTPLS LSVAIGQFAS ISSKSSQSLV GAGGKTYLYW LLQ^{RS}SGQSPK
RLIYLVSTLD SGIPDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLGV YYC^{LQ}GT^{HP}
HTFGAGTNLE IK

Región VL del Ac 1548 de Rata (secuencia alternativa a SEQ ID NO: 59) SEQ ID NO: 82

gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcgggtg ccattggaca
accagcctcc atctcttcta agtcaagtca gagcctcgta ggtgctggg
gaaagacata tttgtattgg ttattacaga ggtcgggcca gtotccaaag
cgactaatct atctgggtgtc cactctggac tctggaattc ctgatagggt
cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc cgcagagtgg
aagcogatga tttgggaggt tattactgct tgcaaggta^c acattttcct
cacacgtttg gagctgggac caacctggaa ataaaa

Región VH del Ac 1548 de Rata (secuencia alternativa a SEQ ID NO: 60) SEQ ID NO: 83

EVPLVESGGG SVQPGRSMKL SCVVSGFTFS NYGMVWVRQA PRKGLEWVAY
IGSDGDNTYY RDSVKGRFTI SRNNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCTTGI
VRPFLYWQGG VMVTVS

Región VH del Ac 1548 de Rata (secuencia alternativa a SEQ ID NO: 61) SEQ ID NO: 84

gaggtgcgc tgggtggagt tggggggcgc tcagtgcagc ctgggaggtc
catgaaaact tctgtgttag tctcaggatt cactttcagt aactatggca
tgggtctgggt ccgccagggt ccaaagaagg gtctggagtg ggtogcatat
attggttctg atggtgataa tacttactac cgagattccg tgaagggccg
attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat ttgcaaatgg
acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt
gtccggccct ttctctactg gggccaagga gtcattggtca cagtctcg

Figura 1Z

Cadena pesada de IgG1 de 1519gH20 (V + constante de gamma 1 humana, exones subrayados una base cambiada de la SEQ ID NO: 71) SEQ ID NO: 85

gaggtaccac ttgtggaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggag ttacgtctc
 tcttgtgtg tgtgtggtt cacottctcc aattacggaa tgggtctgggt cagacaagca
 cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa cacctactat
 cgggattccg tgaaggagc ctacacaatc tcccgagata acgccaagag ctactgtac
 ctgcagatga atagcctgag agcggaggat actgcctgtt actattgcac aacgggaatc
 gtagggcctt tctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag cgtctctaca
 aagggcocat cgtgtctcc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
 ggcctgggct gctgtgtcaa ggaactctc ccggaacggg tgacgggtgtc gtggaactca
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc ccggtgtctc tacagtctc aggaactctc
 tccctcagca gctgtgtgac cgtgcctctc agcagcttgg gcacctcagc ctacatctgc
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttggtga gaggccagca
 caggaggagg ggtgtgtctc tggaagccag gctcagcgt cctgcctgga cgcctccgg
 ctatgcagcc ccagtcagc gcagcaaggc aggcctcgtc tgctcttca ccggaggcc
 tctgcctcgc cactcctgc tcaggagag ggtctctctg cttttctccc aggtctctgg
 caggcacagg ctagggtccc ctaaccagc cctgcacac aaaggggcag gtgtctgggt
 cagacotgc aagagccata tccgggagga cctgcctctc gacctaagcc caccocaaag
 gccaaactct cactcctc agctcggaca cttctctctc tccagatct gactaactcc
 caatctctc tctcagagc ccaaatctt tgacaaaact cacacatgc cactgtctc
 aggtaaagca gccaggcct cgcctcag ctcaaggcgg gacaggtgc ctagagtgc
 ctgcctcag ggacaggcc cagcgggtg ctgacagtc cactctcctc tctctcag
 caactgaact cctgggggga cgtcagctc tctctctccc cccaaaaccc aaggacaacc
 tcatgatctc cggacccct gaggtcacat gctgtgtgtg ggacgtgagc cagcaagacc
 ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggagc gctgtggagt gcataatgc aagacaaagc
 cgcgggagga gcagtacaac agcagctacc gtgtgtctc cgtctctacc gctctgacc
 agactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctccagccc
 ccatcgagaa aacctctcc aaagccaaag gtgggacccg tggggtgcga gggccacatg
 gacagaggcc ggtctggccc acctctgc ctgagagtga ccgtgtacc aacctctgc
 cctacagggc agcccccaga accacagggtg tacaacctgc cccatcccg gcatgagctg
 accaagaacc aggtcagct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgcctctgc
 gtggagtggg agagcaatg gcagccggag acaactaca agaccagcc tccgtgtctg
 gactccgagc gctctctct cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag
 caggggaaag tctctctatg ctctgtatg catgagctc tgcaaacca ctacagcag
 aagagctct cctgtctcc gggtaaa

Figura 1AA

Cadena pesada de IgG1 de 1519gH20 (V + constante de gamma 1 humana) con secuencia señal subrayada y en cursiva (una base cambiada de la SEQ ID NO: 72) SEQ ID NO: 86

atggaatgga gctgggtctt tctctctctt ctgtcagtaa ctacaggagt ccattctgag
gtaccacttg tggaaagcgg aggaaggctt gtgcaggctg gaggaaattt acgtctctct
tgtcctgtgt ctggtctcac cttctccaat tacggaatgg tctgggtcag acaagcacct
ggaaaggggt ttgaatgggt ggcctatatt gactctgacg gggacaacac ctactatcgg
gattccgtga aaggacgctt cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
cagatgaata gctgagagg cgaggatact gccgtgtact attgcacaac gggaaatcgtt
aggtcttttc tgtactgggg acagggcacc ttggttacgt tctcgagcgc ttoracaaag
ggcccatcgg tcttccctcc ggcacccctc tccaaagaga cctctggggg cacagcggcc
ctgggctgcc tggtaaggga ctacttccc gaaccggtag cgggtgtcgt gaactcagge
gcctgacca ggggcgtgca caccctcccg gctgtctac agtctcagg actctactcc
ctcagcagcg tggtagcctt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac
gtgaalcaaa agcccagcaa caccagggtg gacaagaaag ttggtgagag gccagcacag
ggaggagagg tgtctgtctg aagccaggct cagcgtctct gccggagcg atcccgcta
tgcagcccca gtccagggca gcaaggcagg ccccgctctc ctcttcaccc ggaggcctct
gcccgcacca ctcatgtca gggagagggt cttctggctt ttccccagg ctctgggcag
gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc tgcacacaaa ggggcagggt ctgggctcag
acctgccaag agccatatcc gggaggaccc tgcacctgac ctaagcccac ccaaaaggcc
aaactctcca ctccctcagg tcggacaact tctctctcc cagatctgag taactcccaa
tcttctctct gcagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagg
taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aagcgggac aggtgcccta gagtgcctg
catccaggga caggccccag cgggtgtctg acacgtccac ctccatctct tctcaggac
ctgaactcct ggggggagcc tcagttctcc tcttccccc aaaacccaag gacacctca
tgatctcccg gacccctgag gtccatctcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg
aggtcaagtt caactggtag ggggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaagccgc
gggaggagca gtacaacagc acctaccgtg tggtaagcct cctcaccgtc ctgcaccagg
actggctgaa tggcaaggag taacaggtag aggtctccaa caaagccctc ccagcccca
tccagaaaaa catctccaaa gccaaagggt ggaaccgtgg ggtgcgaggg ccacatggac
agaggccggc tcggccccc ctctgcccct agagtgaacg ctgtaccaac ctctgtccct
acagggcagc cccgagaacc acagggtgac accctgcccc catcccgga tgagctgacc
aagaaccagg tcagcctgac ctgcccgtgc aaaggcttct atcccagca catcgccgtg
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa cactacaaga ccaagcctcc cgtgctggac
tccgaagggt ccttcttct ctacagcaag ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag
gggaacgtct tctcatctc cgtgatgcct gaggctctgc acaaccacta cagcagagag
agcctctccc tgtctccgggtaaa

Cadena pesada de IgG4 de 1519gH20 (V + constante de gamma 4 humana sin mutaciones P) SEQ ID NO: 87

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAYSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY
 IDSDGDNTRY RDSVKGRFTI SRONAKSSLY LQMSLRAED TAVYYCTTGI
 VRPFYIWGQG TLTVVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGKITYTC
 NVDHKFSPNTR VDKRVESKYG PFCPSCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNRGLPSSIE KTISKANGQP REFQVYTLPP
 SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVENES NGQFENNYKT TFPVLDSDGS
 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

Figura 1BB

Cadena pesada de IgG4 de 1519gH20 (V + constante de gamma 4 humana, exones subrayados sin mutaciones P) SEQ ID NO: 88

```

gaggtaaccac ttgtggaaag cggaggaggt ottgtgcagc otggaggaag
tttacgtctc tcttggtctg tgtotggott cactttctcc aattacggaa
tggctctgggt cagacaagca cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat
attgaactctg acgggggacaa cactactat cgggattccg tgaaaggacg
cttcacaaatc tcccagagata acgccaagag ctcaactgtac ctgcagatga
atagcctgag agccgaggat actgccgtgt actattgcac aacgggaatc
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttgggta ctgtctcgag
cgctttctaca aaggggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgcctcagga
gcacctccga gagcacagcc gccctgggct gccctgggcaa ggactacttc
cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt
gcacaccttc ccggtgtgac tacagtcttc aggactctac tccctcagca
gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc
aacgttagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagtttgtga
gaggccagca cagggaggga ggggtgtctg tggaagccag gctcagccct
cctgccctgga cgcaccccgg ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc
atgccccatc tgtctcctca cccggaggcc totgaccacc ccactcatgc
ccagggagag ggtctttctg atttttccac caggctccgg gcagccacag
gctggatgcc cctaccccag gccctgcgca tacaggggca ggtgtgtgcg
tcagacctgc caagagccat atccggggagg acctgcctcc tgacctaaagc
ccacccccaaa ggcacaaactc tccactccct cagctcagac acctctcttc
ctcccagatc tgagtaactc ccaatcttct ctctgcagag tccaaatatg
gtcccccctg cccatcatgc ccaggtaagc caaccaggc ctgcctctcc
agctcaaggc gggacagggt ccttagagta gctgtcatcc agggacaggc
cccagccggg tgcgtgacga tccacctcca tctcttcttc agcacctgag
ttcttggggg gacctcagct ctctctgttc cccccaaaac ccaaggacac
tctcatgac tcccggaccc ctgagggtcac gtgcgtggtg gtggaactga
gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtgga
gtgcataatg ccaagacaaa gcccggggag gacagttca acagcaogta
ccgtgtggtc agcgtctctc ccgtctctga ccaggactgg ctgaacggca
aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaaag gctccctgtc ctccatcgag
aaaaccatct ccaaagccaa aggtggggacc cacggggtgc gagggccaca
tggaacagag tcagctcggc ccacctctg cctggggagt gaccgtgtg
ccaacctctg tccctacagg gcagccccga gaggccacagg tgtacacctt
gcccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggctcagc ctgacctgcc
tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga
cggctccttc ttctctctca gcaggctaac cgtggacaag agcagggtggc
aggaggggaa tgtcttctca tgcctcgtga tgcctgaggc tctgcacac
cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggtaaa

```

Figura 1CC

Cadena pesada de IgG4 de 1519gH20 (V + constante de gamma 4 humana) con secuencia señal subrayada y en cursiva- sin mutaciones P SEQ ID NO: 89

atggaatgga gctgggtcct tctctctctc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctgag gtaccacttg tggaaagcgg aggaggtcct gtgcagcctg
gaggaagttt acgtctctct tgtgctggt ctggcttcac cttctccaat
tacggaatgg totgggtcag acaagcaoct ggaaagggtc ttgaatgggt
ggcctatatt gactctgacg gggacaacac ctactatcgg gattccgtga
aaggacgctt cacaatctcc cgagataacg ccaagagctc actgtacctg
cagatgaata gcctgagagc cgaggatact gccgtgtaot attgcacaac
gggaatcgtt aggccttttc tgtactgggg acaggggcaoc ttggttactg
tctcgagcgc ttctacaaag ggcccatccg tcttccccc tggccctgc
tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tgggtcaagga
ctaattcccc gaacccgtga cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca
gcggcgtgca caccttcccg gctgtctctac agtctcagc actctactcc
ctcagcagcg tgggtgacgt gccctccagc agcttgggca cgaagacctc
cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag
ttgggtgagag gccagcacag ggaggggagg tgtctgctgg aagccaggct
cagccctcct gcctggacgc accccggctg tgcagcccca gcccagggca
gcaaggcatg ccccatctgt ctctccccc ggaggcctct gaccacccca
ctcatgccc gggagagggt cttctggatt ttccaccag gctccgggca
gccacagget ggatgcccct accccaggcc ctgggcatac aggggcaggt
gctgcgctca gacctgccaa gagccatctc cgggaggacc ctgcccctga
cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc actccctcag ctccagacac
ttctctctct ccagatctga gtaactccca atcttctctc tgcagagtcc
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc ggtaagccaa cccaggctcc
gccctccagc tcaaggcggg acagggtgcc tagagtacc tgcattccagg
gacaggcccc agccgggtgc tgacgcctcc acctccatct ctctccagc
acctgagttc ctggggggac catcagttct cctgttcccc ccaaaaacca
aggacactct catgatctcc cggacccctg aggtcacgtg cgtggtgggtg
gacgtgagcc aggaagacc cgagggtccag ttcaactggt acgtggatgg
cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gggggaggag cagttcaaca
gcacgtaccg tgtgggtcagc gtctccaccg tctgcacca ggactggctg
aacggcaagg agtacaagtg caagggtctc aacaaaggcc tcccgtcttc
catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggacccac ggggtgcgag
ggccacatgg acagagggtc gctcgcccca cctctgccc tgggagtgc
cgtgtgcca acctctgtcc ctacagggca gcccagagag ccacagggtg
acaacctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtaagctg
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga
gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg
actccgacgg ctctctcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc
aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct
gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaa

Figura 1DD

Región V de 1519 gL20 (expresión en mamíferos alternativa a la SEQ ID NO: 17) SEQ ID NO: 90

```

gacatccaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca agtcctccca gtccctggtc ggagccctccg
gcaagaccta cctgtactgg ctgttccaga agcccggcaa ggcccccaag
cggtgatct acctggtgtc taccctggac tccggcatcc cctcccggtt
ctccggctct ggctctggca ccgagttcac cctgaccatc tccagcctgc
agcccgagga ctccgccacc tactactgtc tgcaaggcac ccaactcccc
cacaccttcg gccagggcac caagctggaa atcaag

```

Cadena ligera de 1519 gL20 (V + constante, expresión en mamíferos alternativa a la SEQ ID NO: 24) SEQ ID NO: 91

```

gacatccaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca agtcctccca gtccctggtc ggagccctccg
gcaagaccta cctgtactgg ctgttccaga agcccggcaa ggcccccaag
cggctgatct acctggtgtc taccctggac tccggcatcc cctcccggtt
ctccggctct ggctctggca ccgagttcac cctgaccatc tccagcctgc
agcccgagga ctccgccacc tactactgtc tgcaaggcac ccaactcccc
cacaccttcg gccagggcac caagctggaa atcaagcgga ccgtggccgc
tccctccgtg ttcattcttc caacctccga cgagcagctg aagtcgggca
ccgcctccgt cgtgtgcctg ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag
gtgcagtgga aggtggacaa cgcctgcag tccggcaact ccaggaatc
cgtcacccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg tctccaccc
tgacctgtc caaggccgac taagagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa
gtgacctacc agggcctgtc cagccccgtg accaagtctt tcaaccgggg
cgagtgc

```

Figura 1EE

Región V de 1519 gH20 (expresión en mamíferos alternativa a la SEQ ID NO: 31) SEQ ID NO: 92

```

gaggtgcccc tgggtggaatc tggcgggcgga ctggtgcagc ctggcgggctc
cctgagaactg tcttgcgccg tgtccggctt caccttctcc aactacggca
tgggtotgggt ccgacaggct cctggcaagg gactggaatg ggtggcctac
atcgactccg acggcgacaa cacctactac cgggactccg tgaagggccg
gttcaccatc tcccgggaca acgccaagtc ctccctgtac ctgcagatga
actccctgcg ggccgaggac accgcggtgt actactgcac cacgggcata
gtgcggcctt ttctgtactg gggccagggc accctgggtca ccgtgtcc

```

Figura 1FF

Cadena pesada de IgG4 de 1519gH20 (V + constante de gamma 4P humana alternativa
a la SEQ ID NO: 44) SEQ ID NO: 93

```

gaggtgcccc  tgggtggaatc  tggcggcgga  ctggtgcagc  ctggcggtc
cctgagactg  tcttgccgcg  tgtccggcct  cactttctcc  aactacggca
tgggtctgggt  ccgacaggct  cctggcaagg  gactggaatg  ggtggcctac
atcgactccg  acggcgacaa  cactactac  cgggactccg  tgaaggggcg
gttcaccatc  tcccgggaca  acgccaagtc  ctccctgtac  ctgcagatga
actccctggc  ggccgaggac  aocgcogtgt  actactgcac  caccggcatc
gtgcgggcct  ttctgtactg  gggccagggc  accctgggtc  ccgtgtcctc
tgccctccac  aagggcocct  ccgtgttccc  tctggccccc  tgcctccggt
ccacctccga  gtctaccgcc  gctctgggct  gcctgggtca  ggactacttc
cccgagcccg  tgacagtgtc  ctggaactct  ggcgccctga  cctccggcgt
gcacaccttc  cctgccgtgc  tgcagtccct  cggcctgtac  tccctgtcct
ccgtcgtgac  cgtgccctcc  tccagcctgg  gcaccaagac  ctacacctgt
aacgtggacc  acaagccctc  caacaccaag  gtggacaagc  ggggtggaatc
taagtacggc  cctccctgcc  cccctgtccc  tgcccttgaa  tttctggggc
gaccttccgt  gttcctgttc  cccccaagc  ccaaggacac  cctgatgatc
tcccggaacc  ccgaagtgtc  ctgogtggtg  gtggacgtgt  ccaggaaga
tcccgaggtc  cagttcaatt  ggtacgtgga  cggcgtggaa  gtgcacaatg
ccaagaccaa  gccagagag  gaacagttca  actccacctc  ccgggtgggtg
tcogtgotga  ccgtgctgca  ccaggactgg  ctgaacggca  aagagtacaa
gtgcaagggt  tccaacaagg  gcctgccctc  cagcatcgaa  aagaccatct
ccaaggccaa  gggccagccc  cgcgagcccc  aggtgtacac  cctgccccct
agccaggaag  agatgaccaa  gaaccagggt  tccctgaact  gtctgtgtca
gggcttctac  cctccgaca  ttgccgtgga  atgggagtc  aacggccagc
ccgagaacaa  ctacaagacc  acccccccct  tgctggacag  ccagggctcc
ttcttccctg  actctcggct  gacogtggac  aagtcccggg  ggcaggaagg
caacgtcttc  tctgtctccg  tgatgcacga  ggccctgcac  aaccaactac
ccagaagtc  cctgtccctg  agcctgggca  ag

```

β 2M humana (SEQ ID NO: 95)

```

IQKTPQIQVYSRHPPENGKPNFLNCYVSQFHPPQIEIELLKNGKKIPNIEMSDLSFSKDWSEFYILAHTFTPTETDVYA
CRVKHVTLEPKTVTWDRDM

```

FIGURA 2A

CADENA LIGERA Injerto 1519

Ligera de 1519	1	5	10	15	20	25	30	abode	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105
	DAVHTQTPLSLGVALGQPASISCSQSSQSYNGASGXTLYLMLFQSGSQPKELIYIVSTLDSGCLPDRFSGSGAETDFTLKIRVFEADDLGIVYVCLOGSTFFPHTFGAGTKLELK																						
VK1 2-1-(1) A30	DIQMTQSPSSLSASWEDKVTITTCRASQGIRN-----DLGIVYQCPKPKAPKELIYAASSLQSGVPSKRFSGSGSGSTEFTLTISSLOPEHDFAIVYCLQMRSYFTFGAGTKLEIK																						
1519 gL20	DIQMTQSPSSLSASWEDKVTITTCRSSQSYNGASGXTLYLMLFQSGSQPKAPKELIYIVSTLDSGCLPDRFSGSGSGSTEFTLTISSLOPEHDFAIVYCLQSTFFPHTFGAGTKLEIK																						

Leyenda

- 1519 = Secuencia de cadena ligera variable de rata
- 1519 gL20 = Injerto humanizado de la cadena ligera variable de 1519 utilizando la linea germinal humana VK1 2-1-(1) A30 como el marco acceptor.
- Las CDR se muestran en negrita/subrayadas
- Los restos de donante se muestran en negrita/cursiva y se resaltan: L36, F37 e I58

FIGURA 2B

CADENA PESADA Injerto 1519

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	
Pesada de 1519	EYELVDSGAVGVQRKRNHLSQVWNGPTFSNYCMVAVRQAIPKQGLEWVA ¹⁵¹⁹ YIDSDGIDNTYYIRDSVYKGRFTIISKAKAGSLYIQMDSLRDREDEATYYCTGTGIVRFFELIMQKQNTIVVG																							
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
VH3 1-3 3-07	EYQLVDSGAVGVQRKRNHLSQVWNGPTFSNYCMVAVRQAIPKQGLEWVA ¹⁵¹⁹ YIDSDGIDNTYYIRDSVYKGRFTIISKAKAGSLYIQMDSLRDREDEATYYCTGTGIVRFFELIMQKQNTIVVG																							
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
1519gH20	EYQLVDSGAVGVQRKRNHLSQVWNGPTFSNYCMVAVRQAIPKQGLEWVA ¹⁵¹⁹ YIDSDGIDNTYYIRDSVYKGRFTIISKAKAGSLYIQMDSLRDREDEATYYCTGTGIVRFFELIMQKQNTIVVG																							
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	

Leyenda

- 1519 = Secuencia de cadena pesada variable de rata
- 1519 gH20 = Injerto humanizado de la cadena pesada variable de 1519 utilizando la línea germinal humana VH3 1-3 3-07 como el marco aceptor.
- Las CDR se muestran en negrita/subrayadas
- Los restos de donante se muestran en negrita/cursiva y se resaltan: P3, V24, S76, T93 y T94

FIGURA 3A Fab' de CA170_01519.g57 se une a las células del clon 34 de MDCK II en pH ácido y neutro.

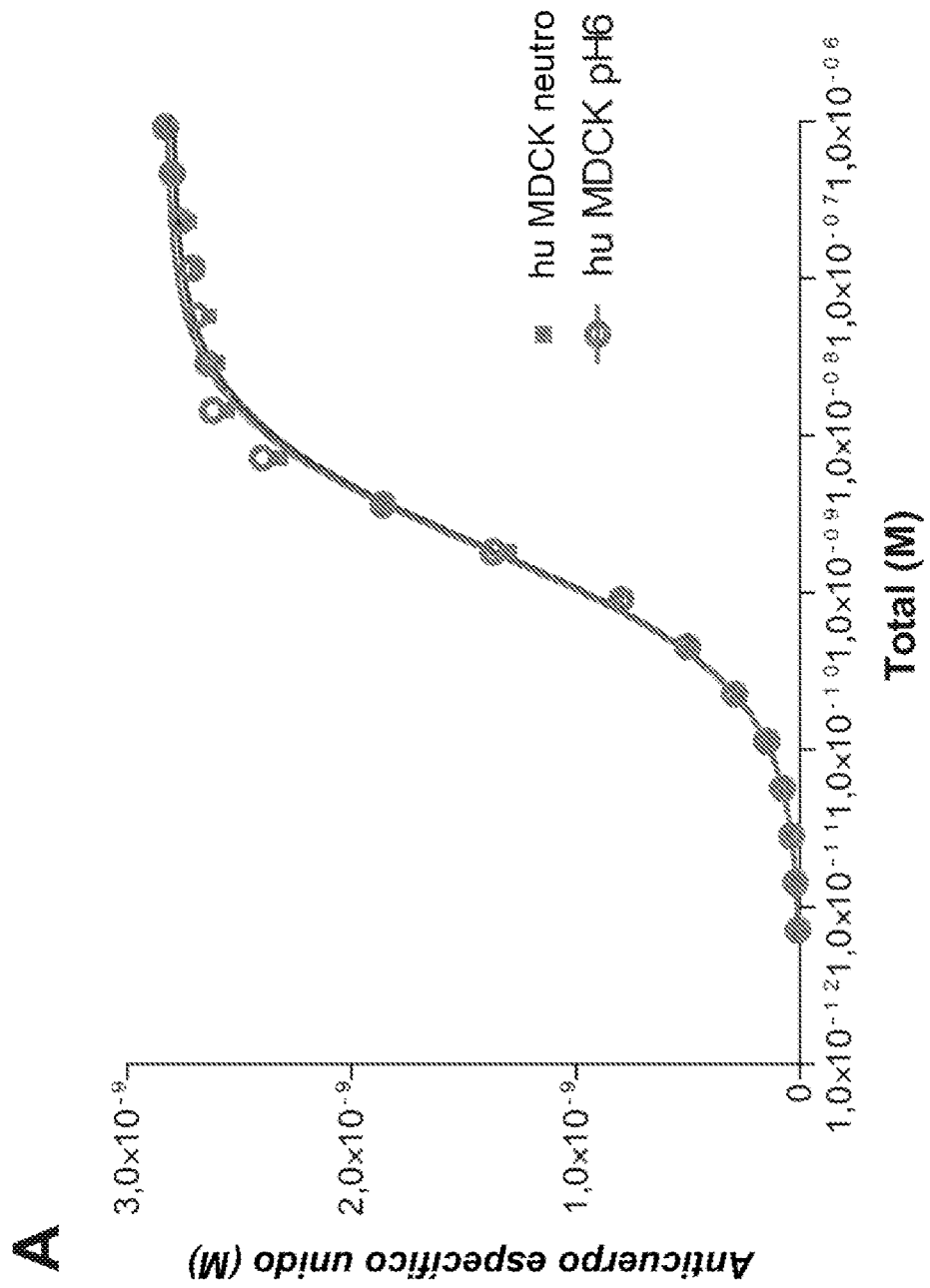


FIGURA 3B Fab'PEG de CA170_01519.g57 se une a las células del clon 34 de MDCK II en pH ácido y neutro.

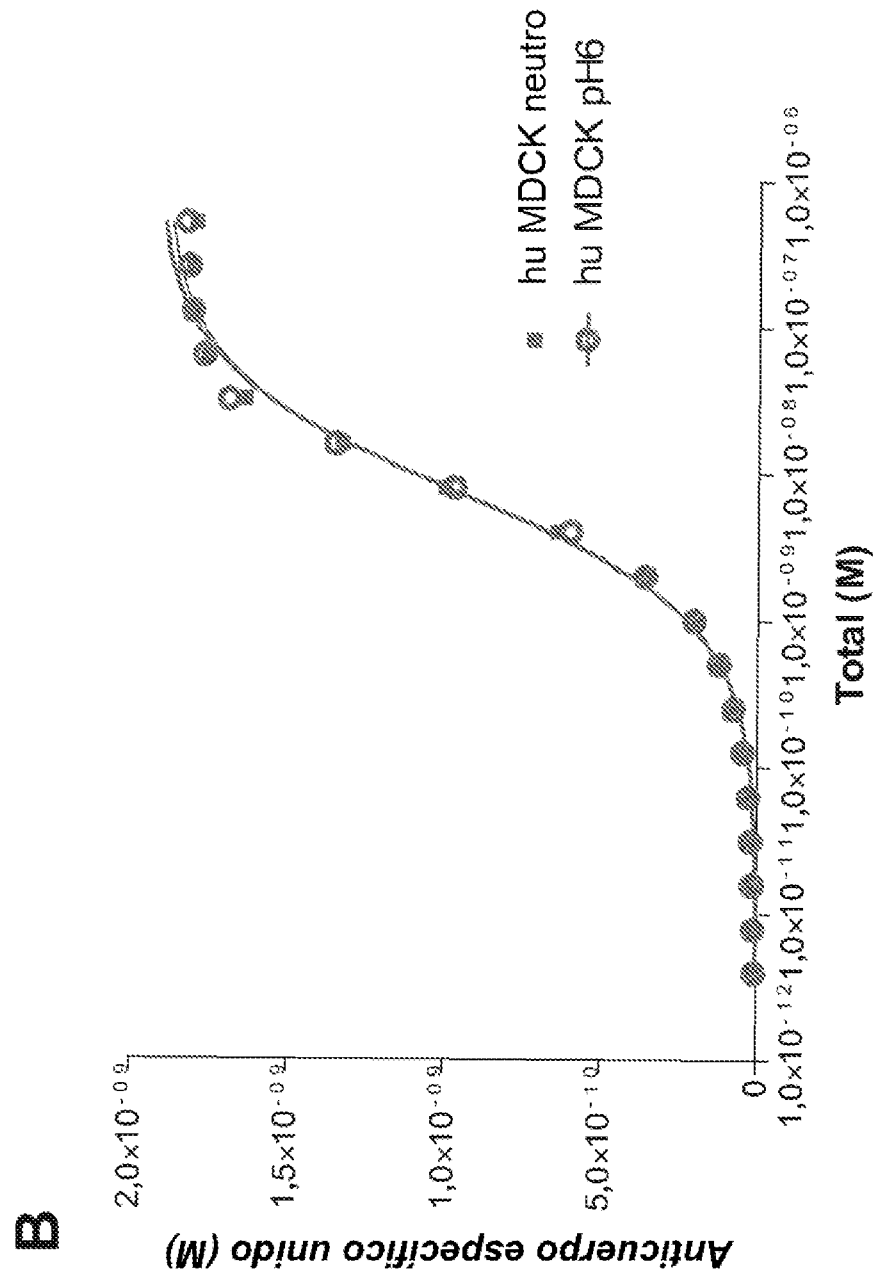
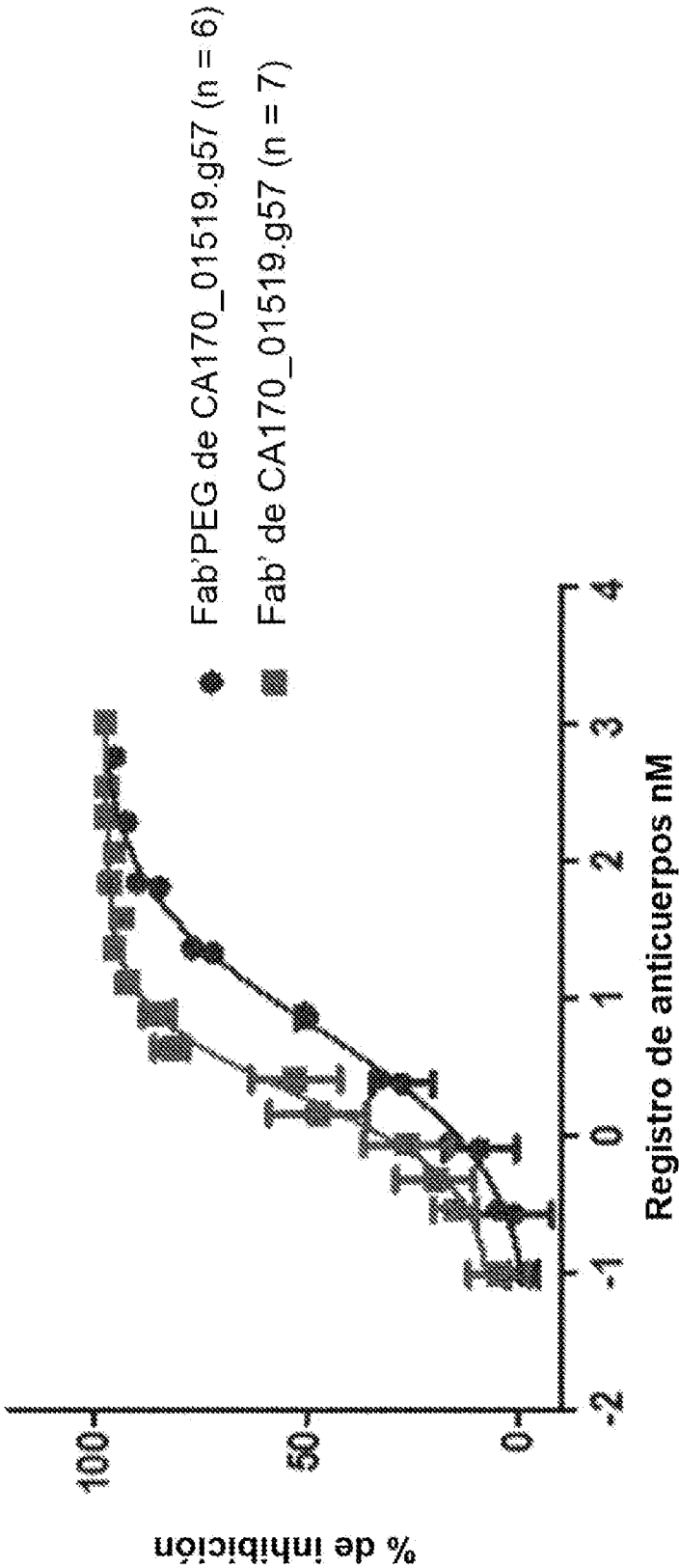


FIGURA 4 CA170_01519.g57 inhibe el reciclado de IgG en células del clon 34 de MDCK II



CE50	Fab'PEG de 1519.g57 (n = 6)	Fab' de 1519.g57 (n = 7)
	6.034	1.937
CI al 95 % (nM)	4.614 a 7.891	1.426 a 2.632

FIGURA 5 Fab'PEG de CA170_01519.g57 inhibe la transcitosis de IgG de apical a basolateral en células del clon 34 de MDCK II

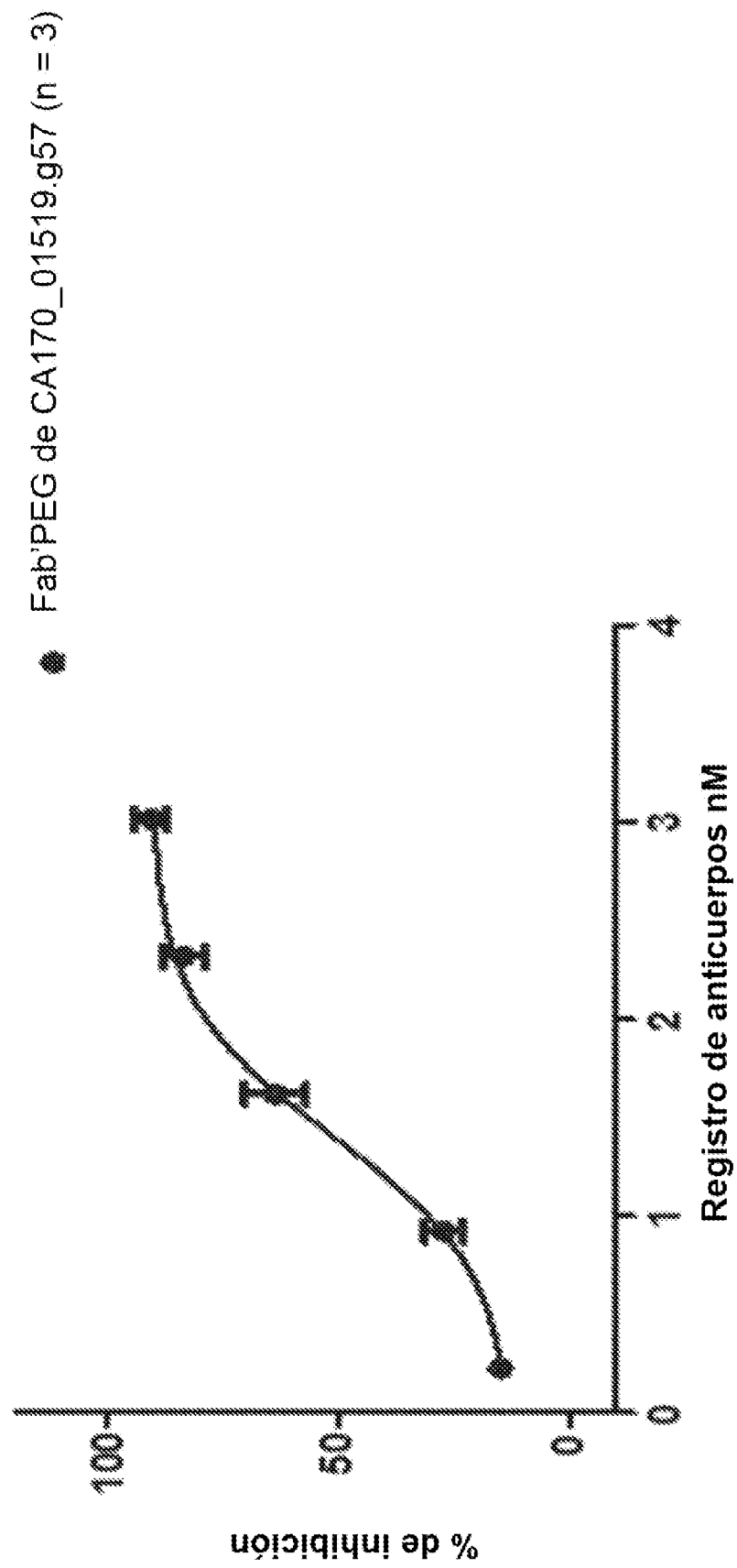


FIGURA 6A Fab' de CA170_01519.g57 se une en células MDCK II (cm) de macaco en pH ácido y neutro

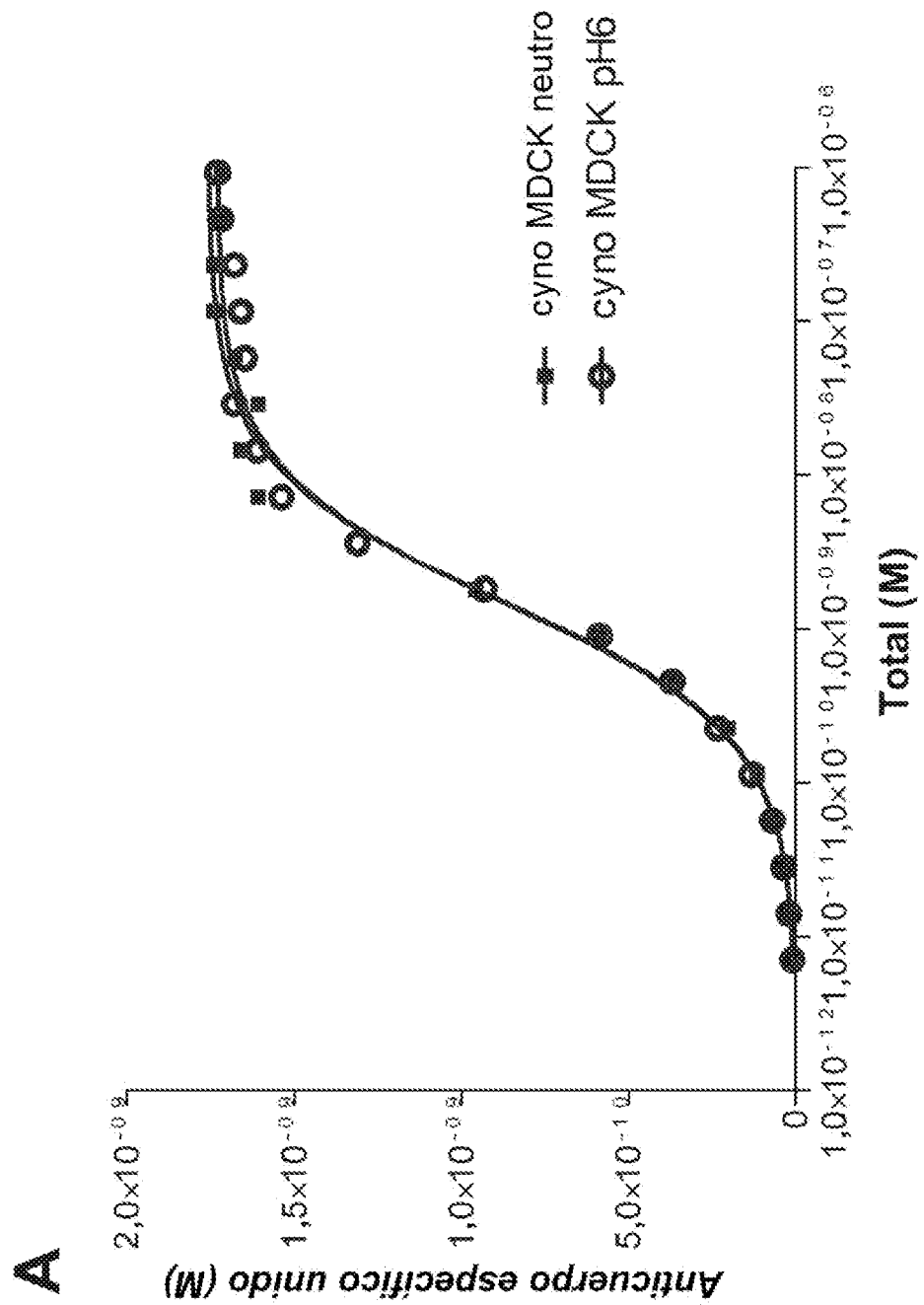


FIGURA 6B Fab'PEG de CA170_01519.g57 se une en células MDCK II (cm) de macaco en pH ácido y neutro

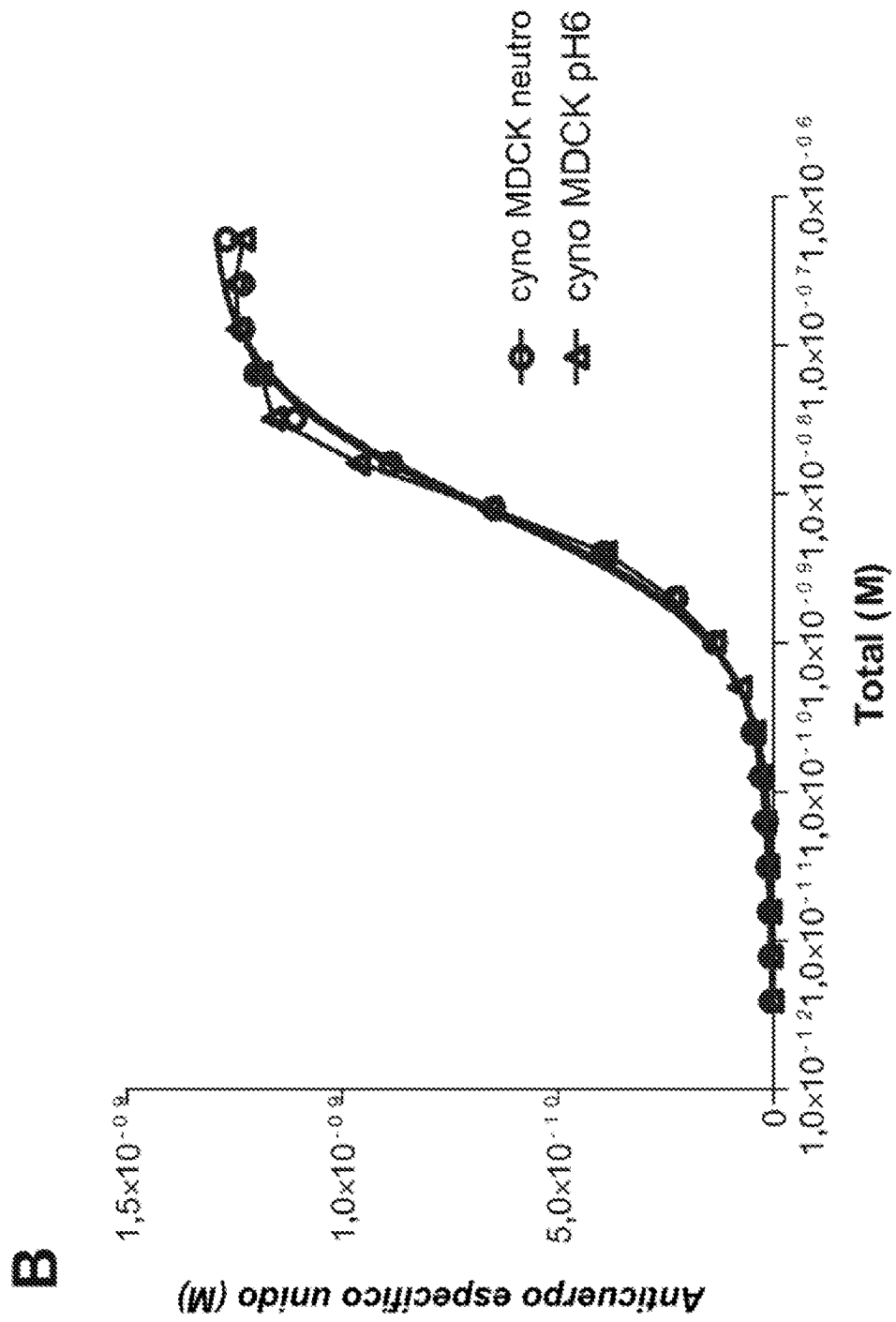


FIGURA 7 CA170_01519.g57 inhibe el reciclado de IgG en células del clon 34 de MDCK II humanas y de macaco y células MDCK II (cm).

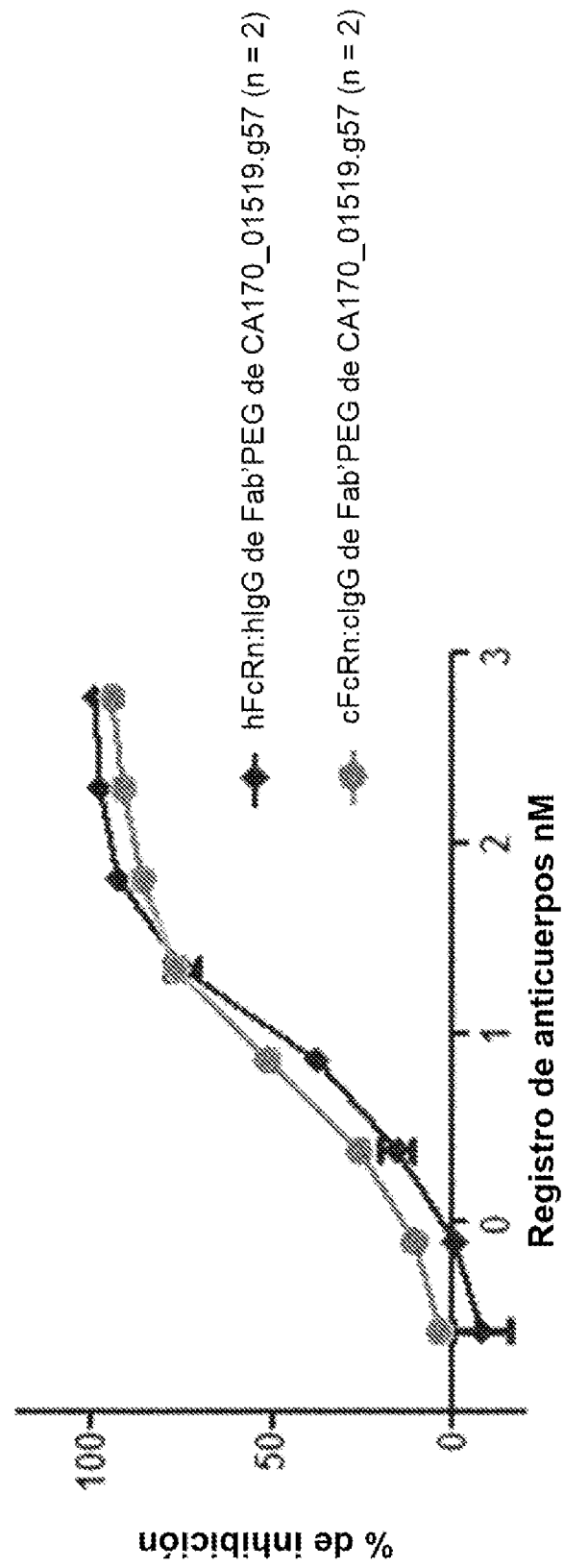


FIGURA 8 Macacos- dosis única de Fab'PEG de 1519 sobre los niveles de IgG en plasma

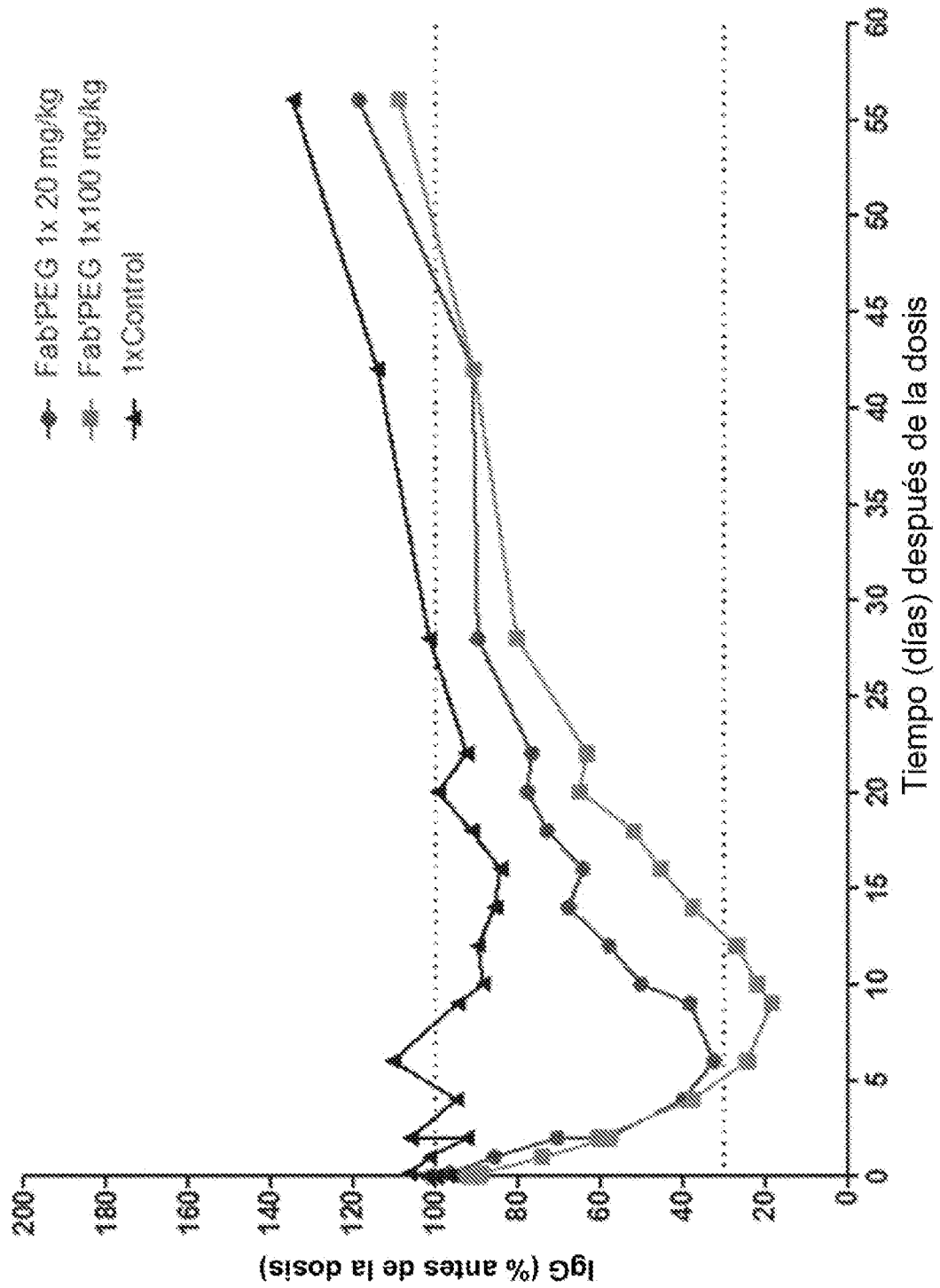


FIGURA 9 Macacos- 4 dosis semanales de Fab'PEG de 1519 sobre los niveles de IgG en plasma

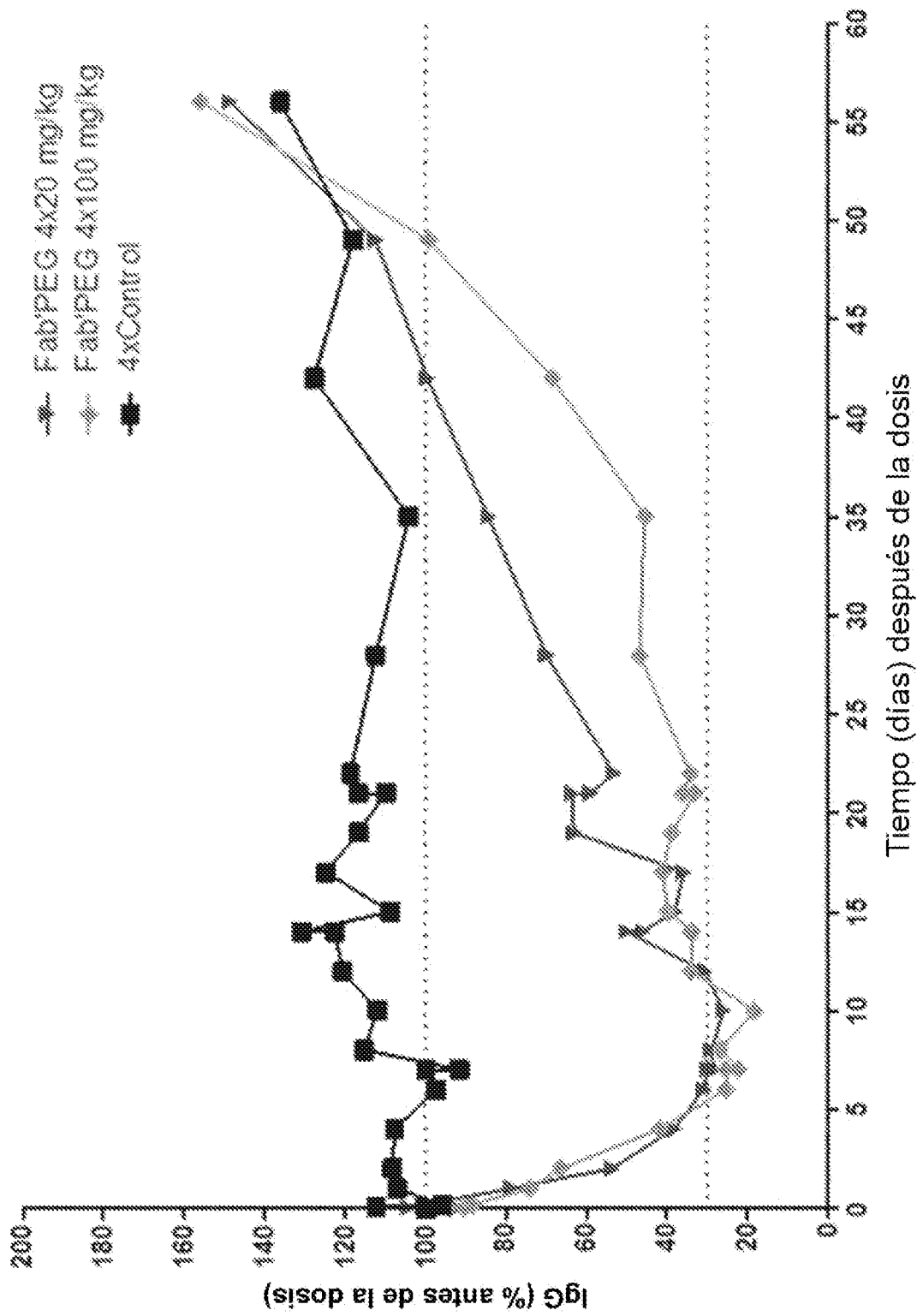


Figura 10

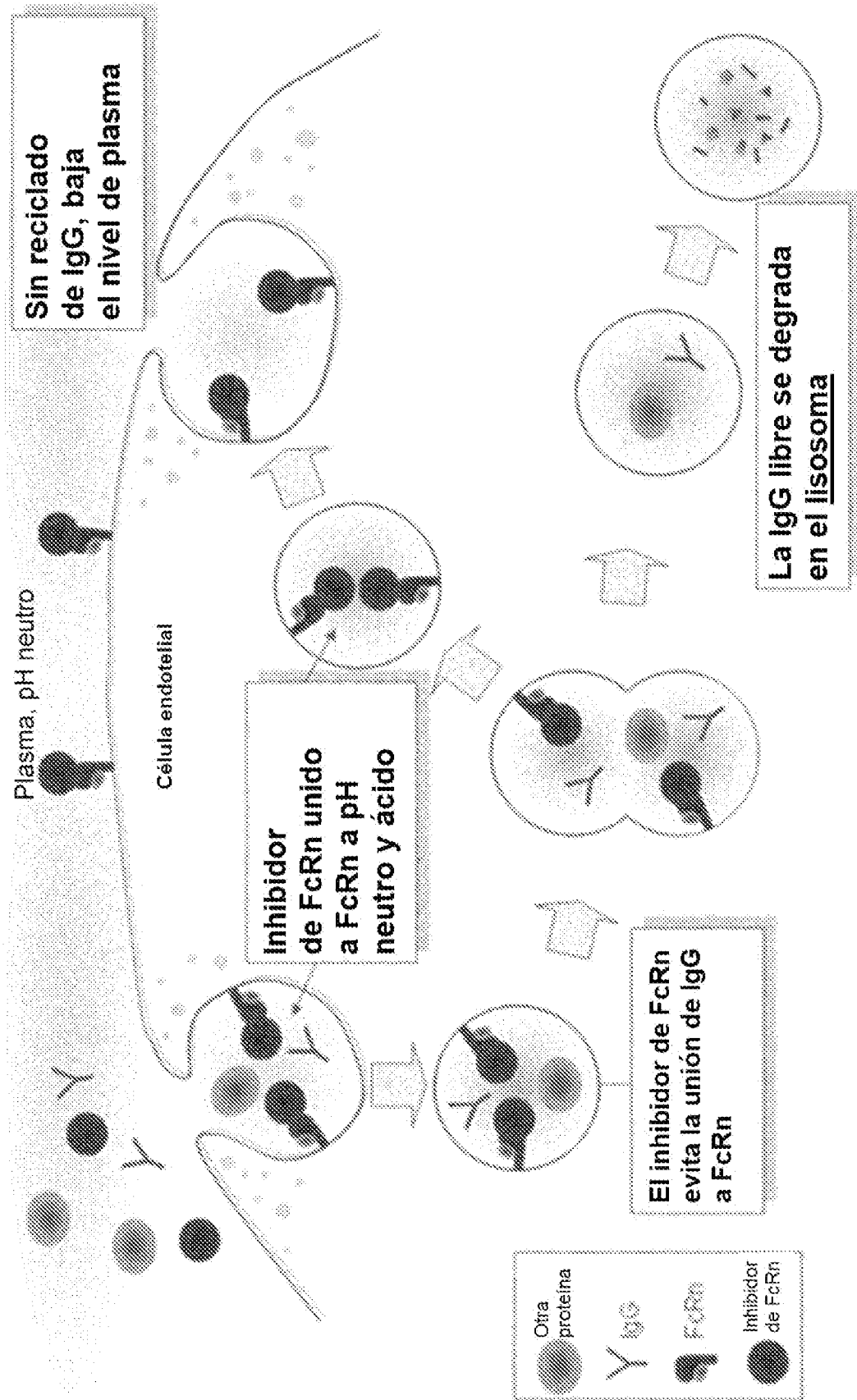


Figura 11 Citometría de flujo basada en ensayos inhibidores de IgG humana utilizando anticuerpos IgG gamma 1 purificados

Ac HuFcRn purificados para humanización – Inhibición de la unión de 488-IgG a HuFcRn (mut) en células HEK293

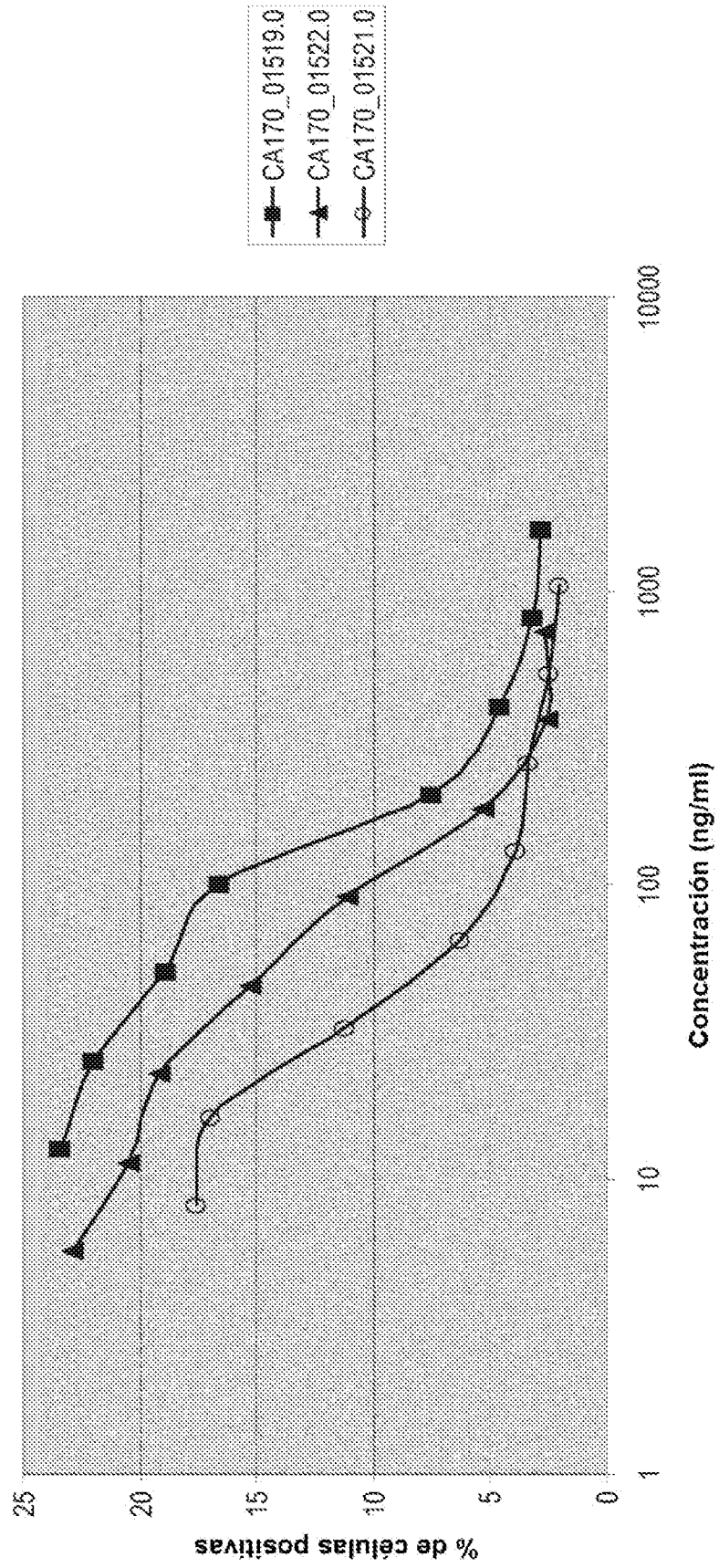


FIGURA 12 Dosis IV de Fab'PEG únicas/intermitentes en la farmacodinámica de IgG normal en macacos (4 animales n: 4-7) --
Fab'PEG de 1519 20 mg/kg los días 1 y 67

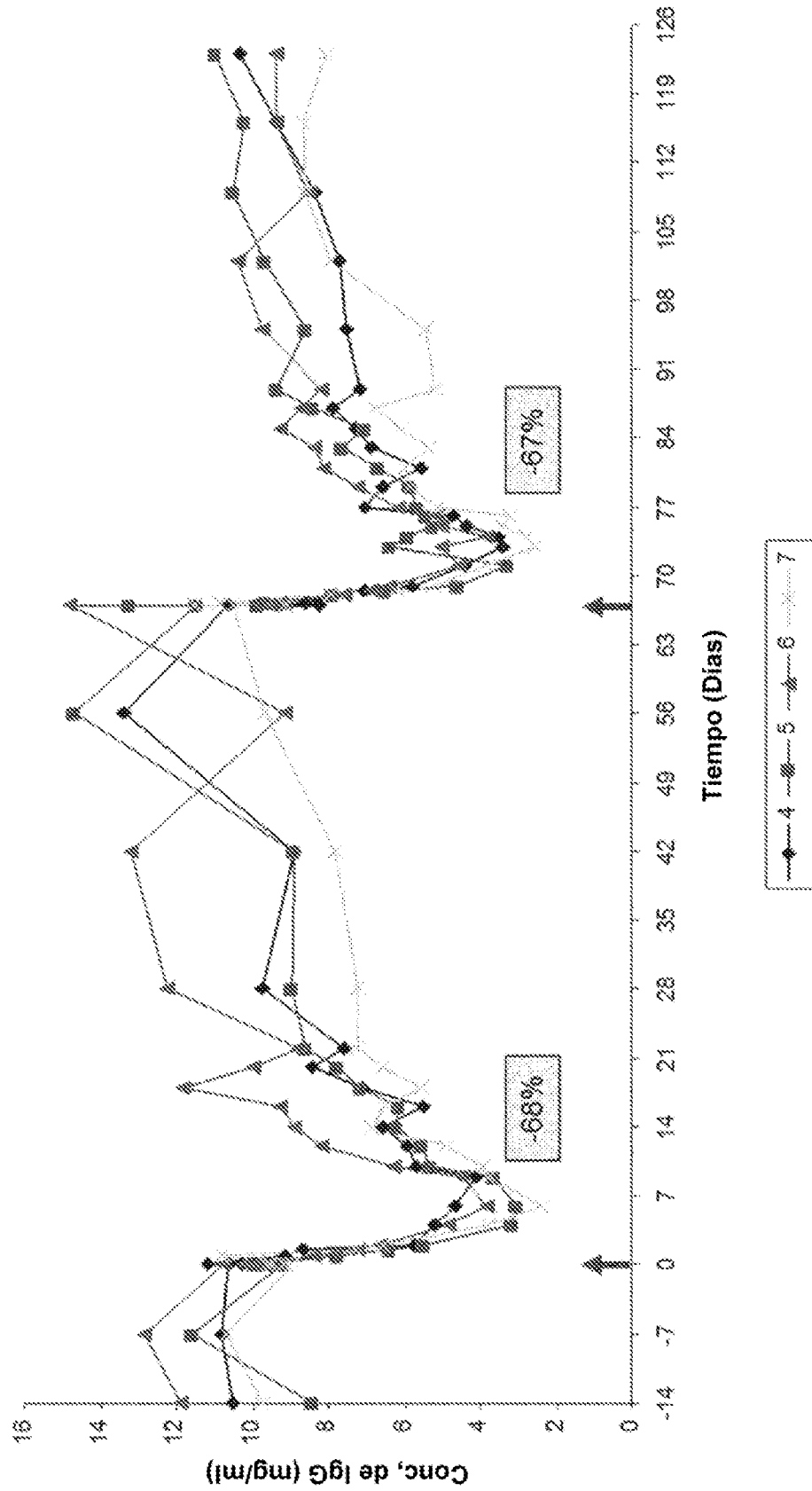


FIGURA 13 Dosis IV de Fab'PEG: repetidas en la farmacodinámica de IgG normal en macacos de 4 x 20 o 100 mg/kg (arriba y abajo, respectivamente) por semana (animales individuales)

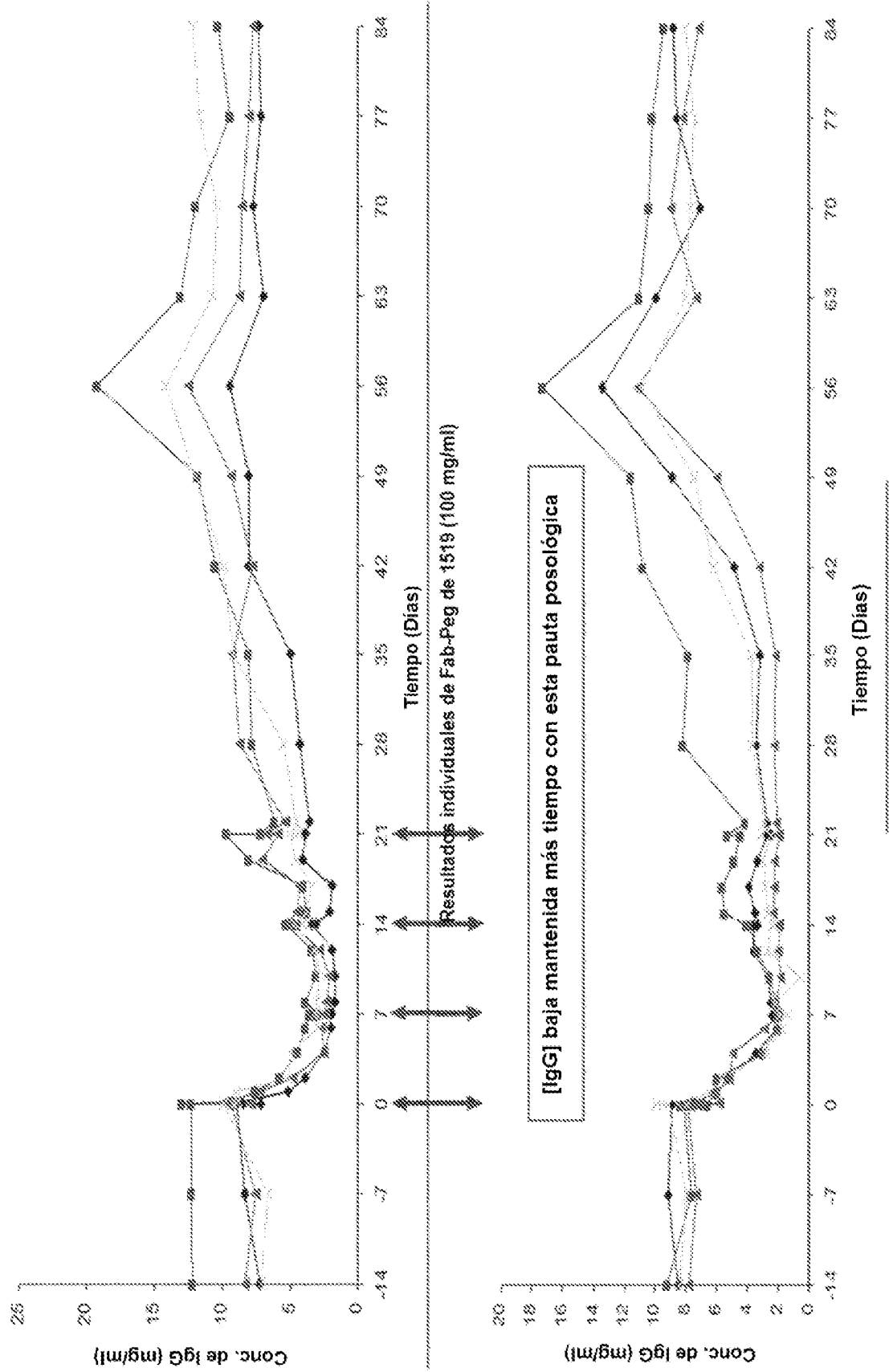


FIGURA 14 Dosis IV de Fab'PEG únicas/intermitentes en la farmacodinámica de IgG normal en macacos a 20 mg/kg y 100 mg/kg los días 1 y 67

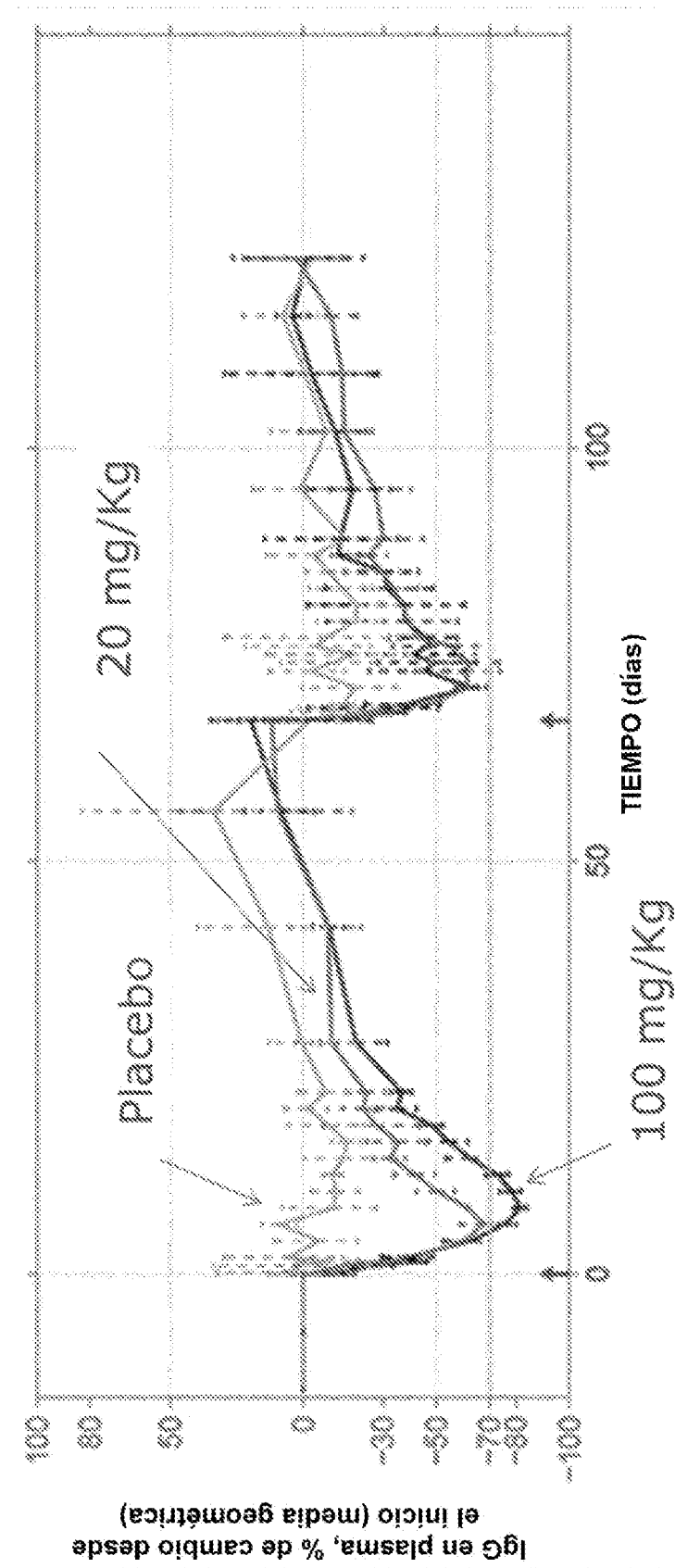


Figura 15 Cambios en los niveles de IgG en plasma en 4 macacos después de 2 dosis IV de 20 mg/kg de Fab'PEG de 1519.g57

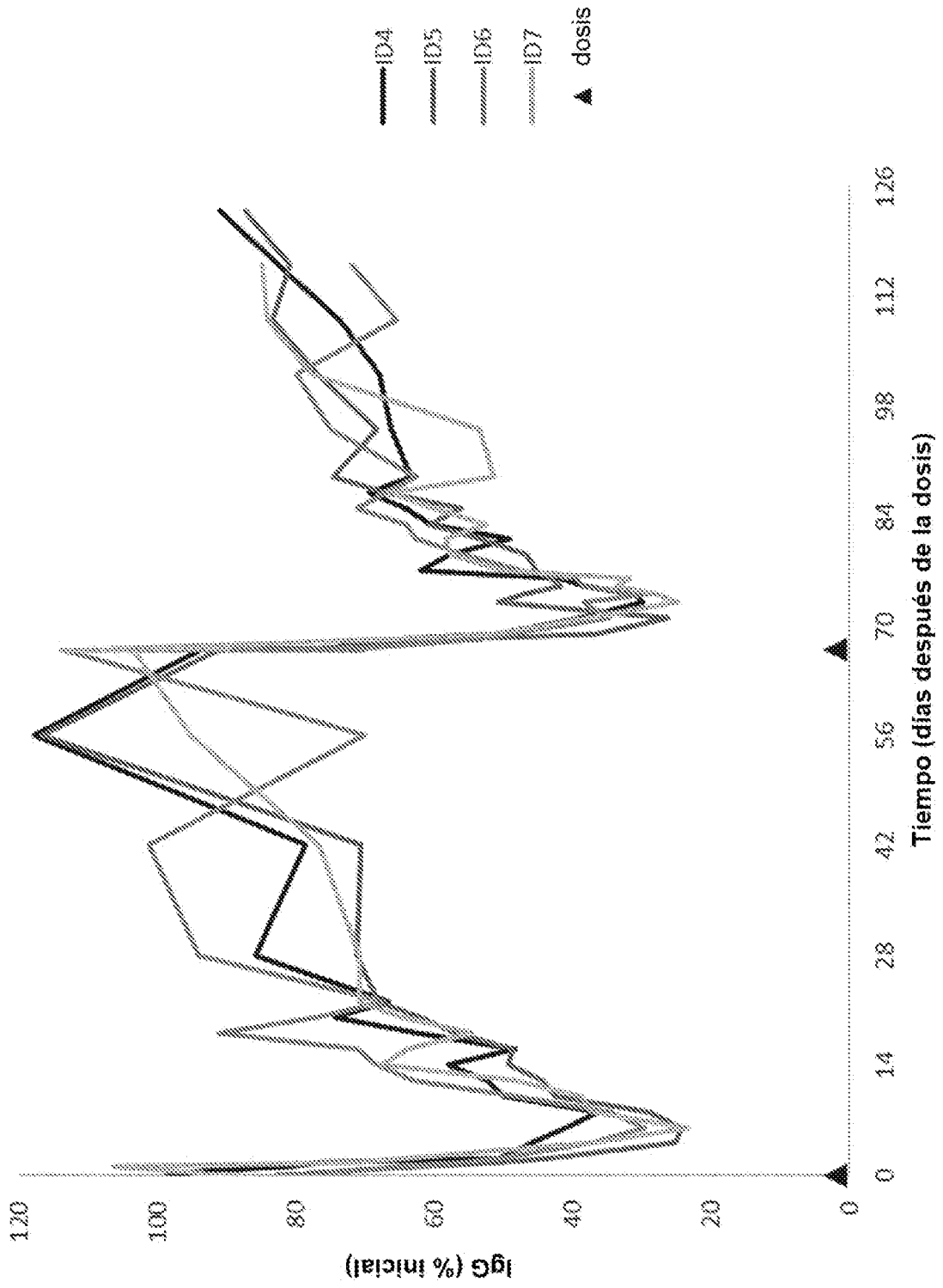


Figura 16 Cambios en los niveles de IgG en plasma en 4 macacos que reciben 10 dosis IV de 20 mg/kg de Fab'PEG de 1519.g57 cada 3 días

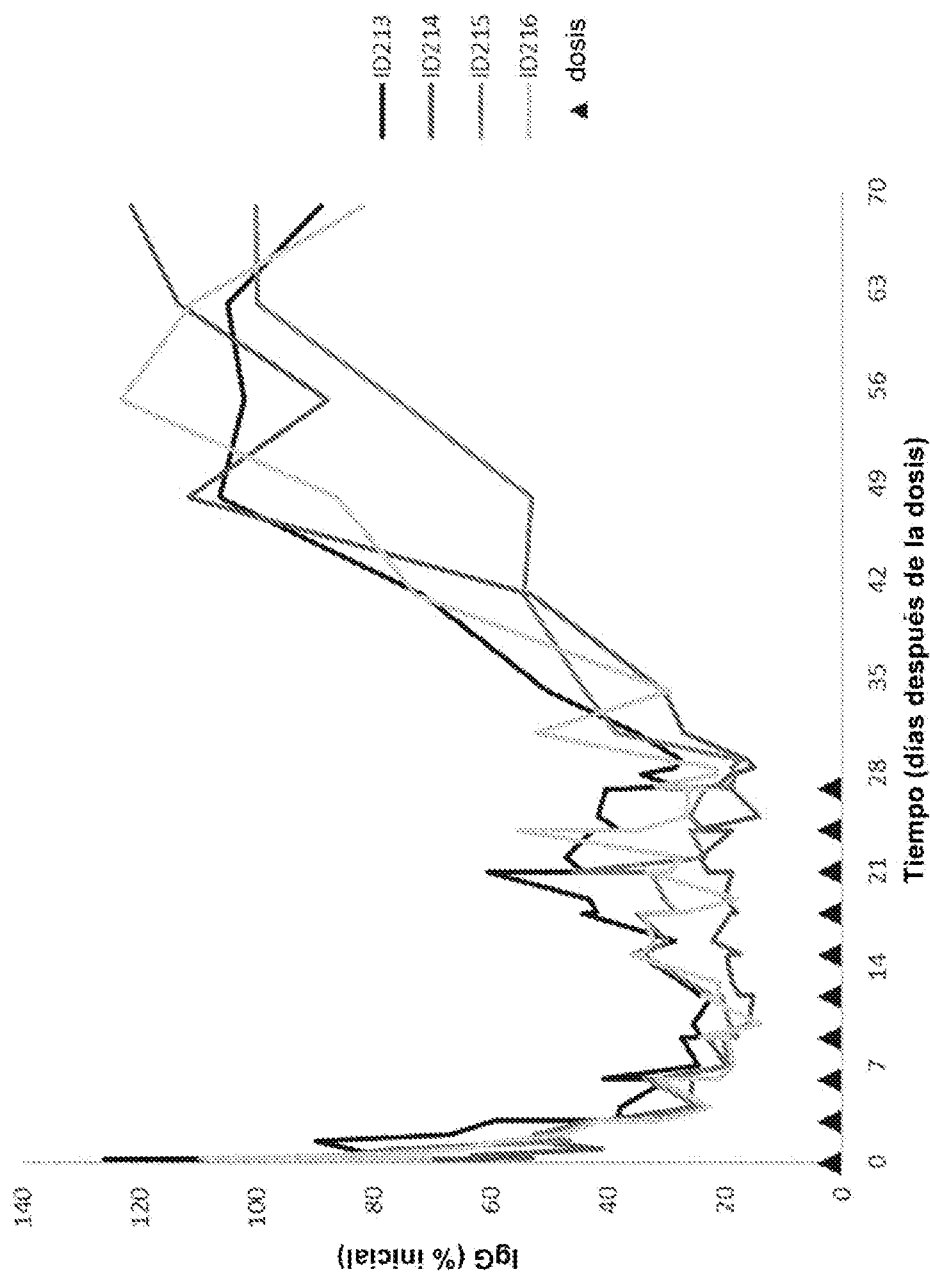


Figura 17 Cambios en los niveles de IgG en plasma en 4 macacos después de 2 dosis IV de 30 mg/kg de IgG4P de 1519.g57 i.v

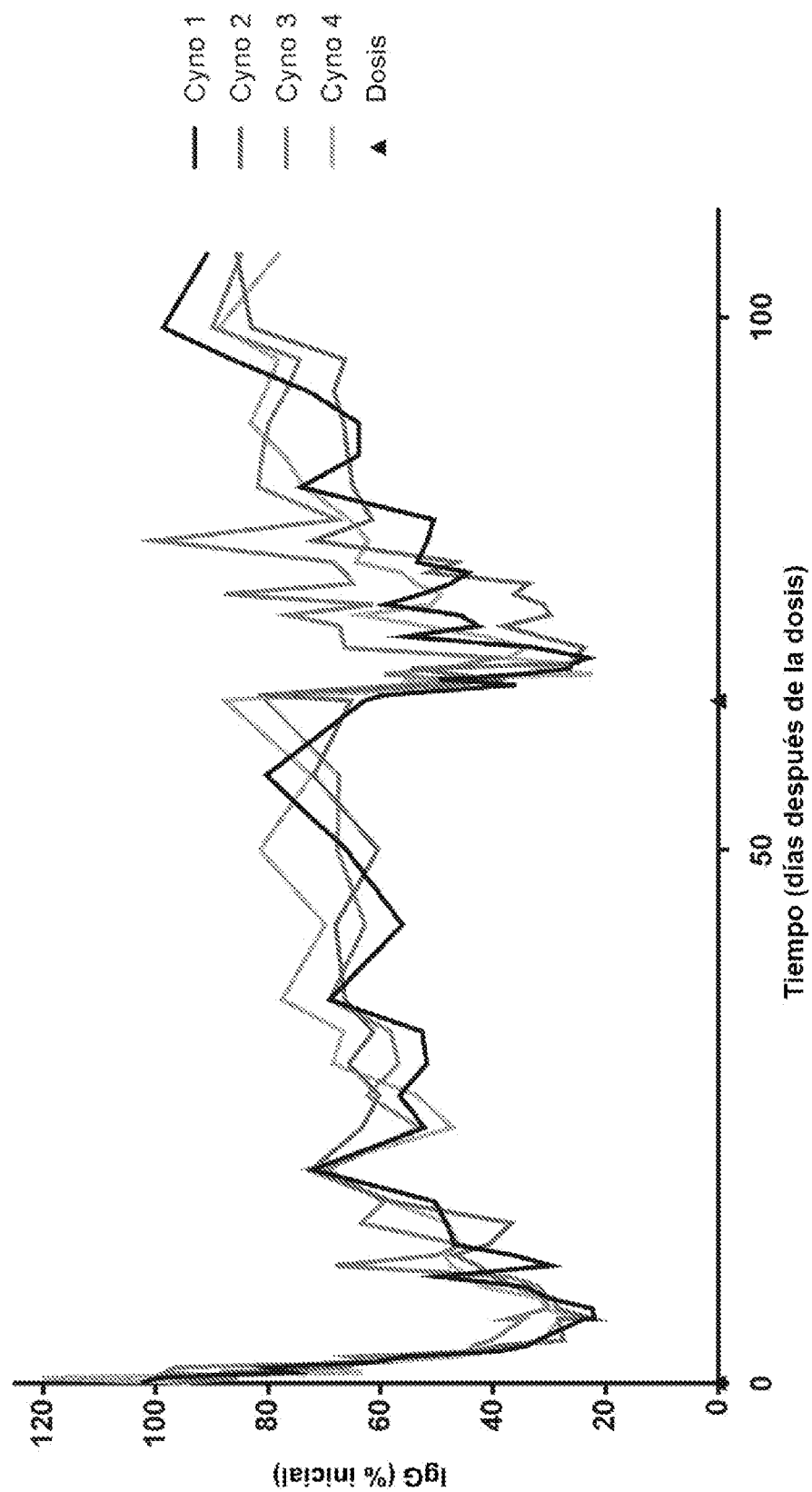


Figura 18 Cambios en los niveles de IgG en plasma en macacos tratados con 30 mg/kg de IgG4P de 1519.g57 en el día 0 seguido de 5 mg/kg de IgG4P de 1519.g57 diariamente durante 41 días

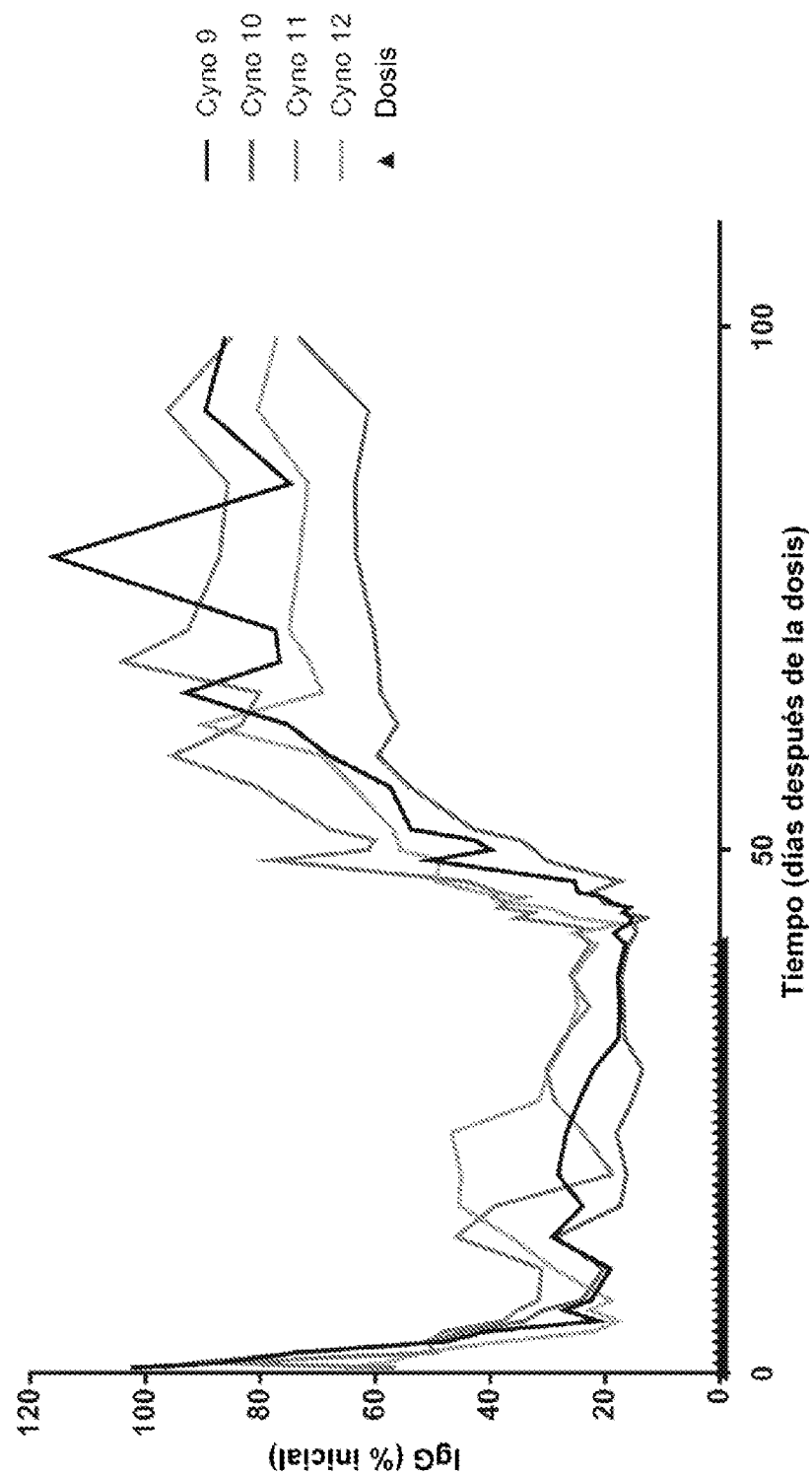


Figura 19 Cambios en los niveles de IgG en plasma en 4 macacos que reciben 42 dosis diarias de vehículo

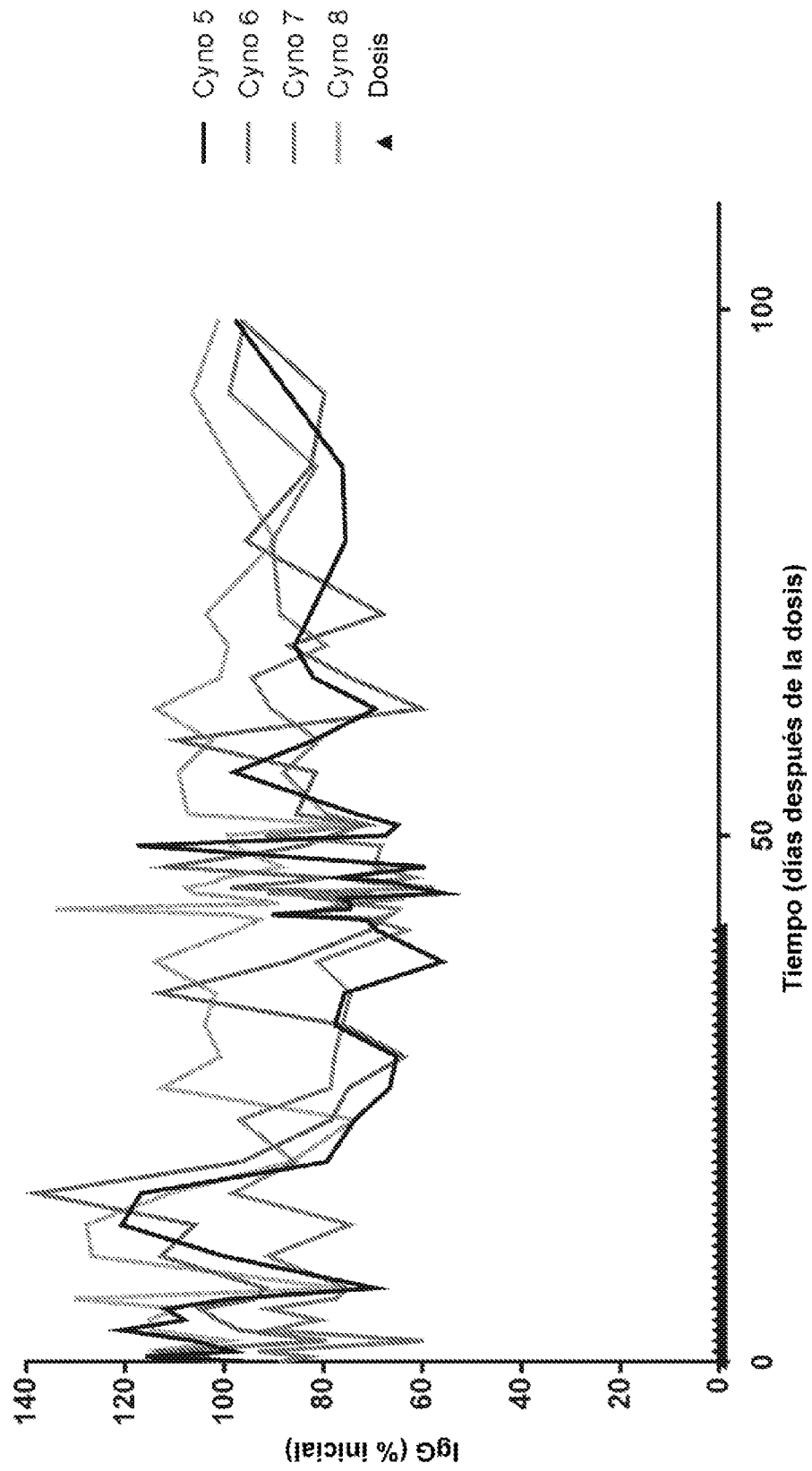


Figura 20 Aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con Fab'PEG de CA170_01519.g57 o PBS IV

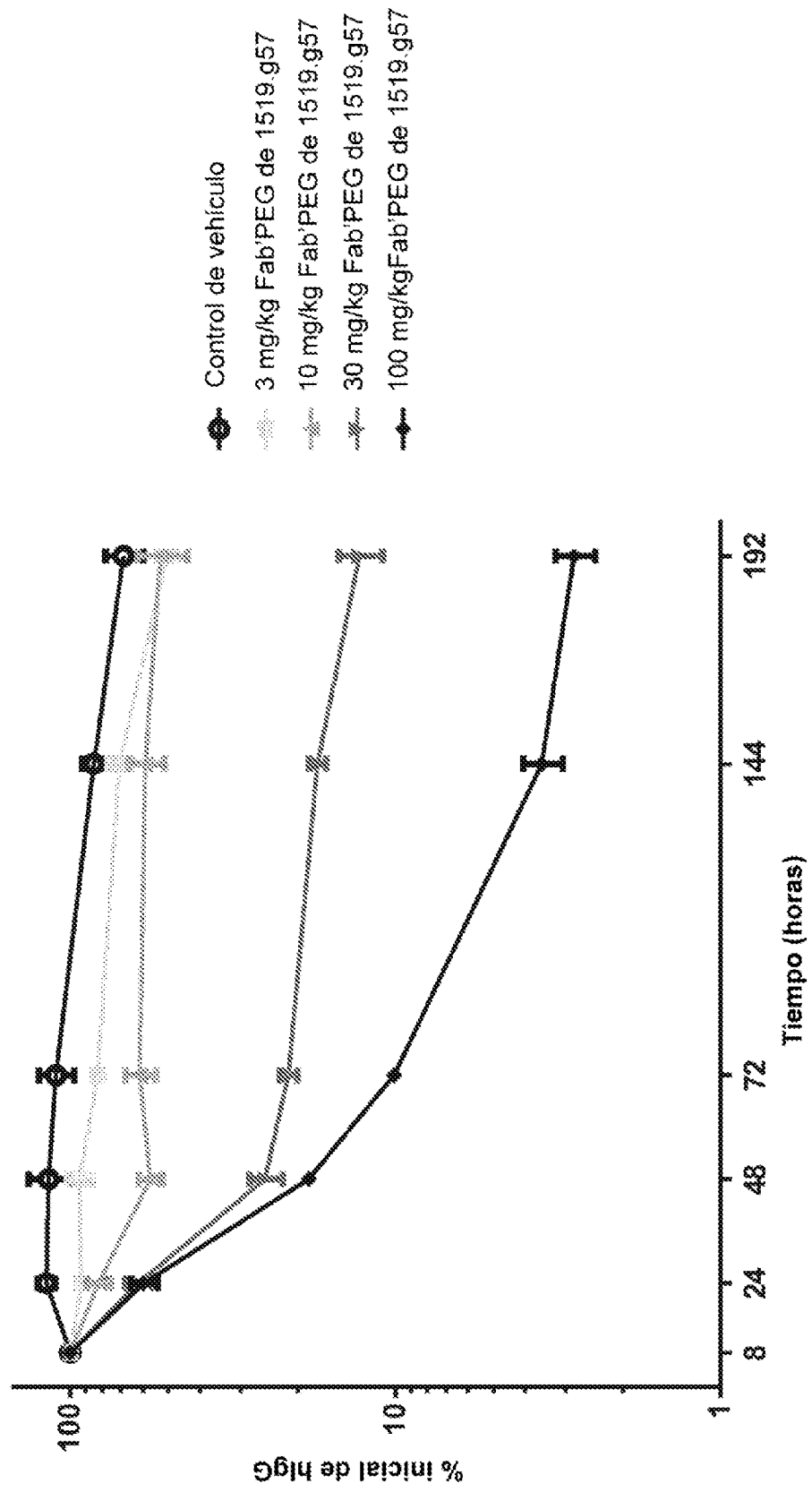


Figura 21 Aclaramiento aumentado de hIgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con IgG1 o IgG4 de CA170_01519.g57 o PBS IV

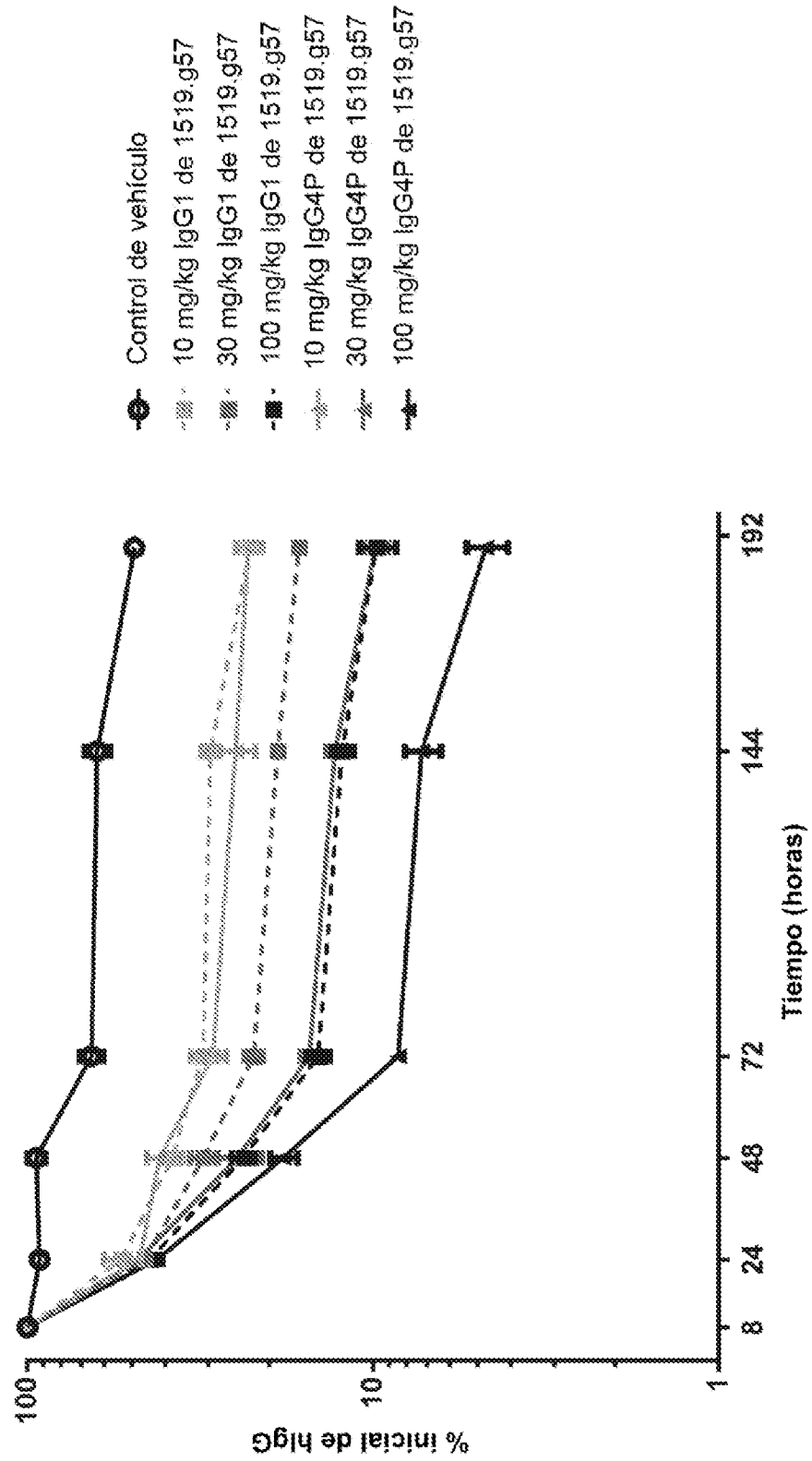


Figura 22 Aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con Fab' - albúmina de suero humano de CA170_01519.g57 o PBS IV

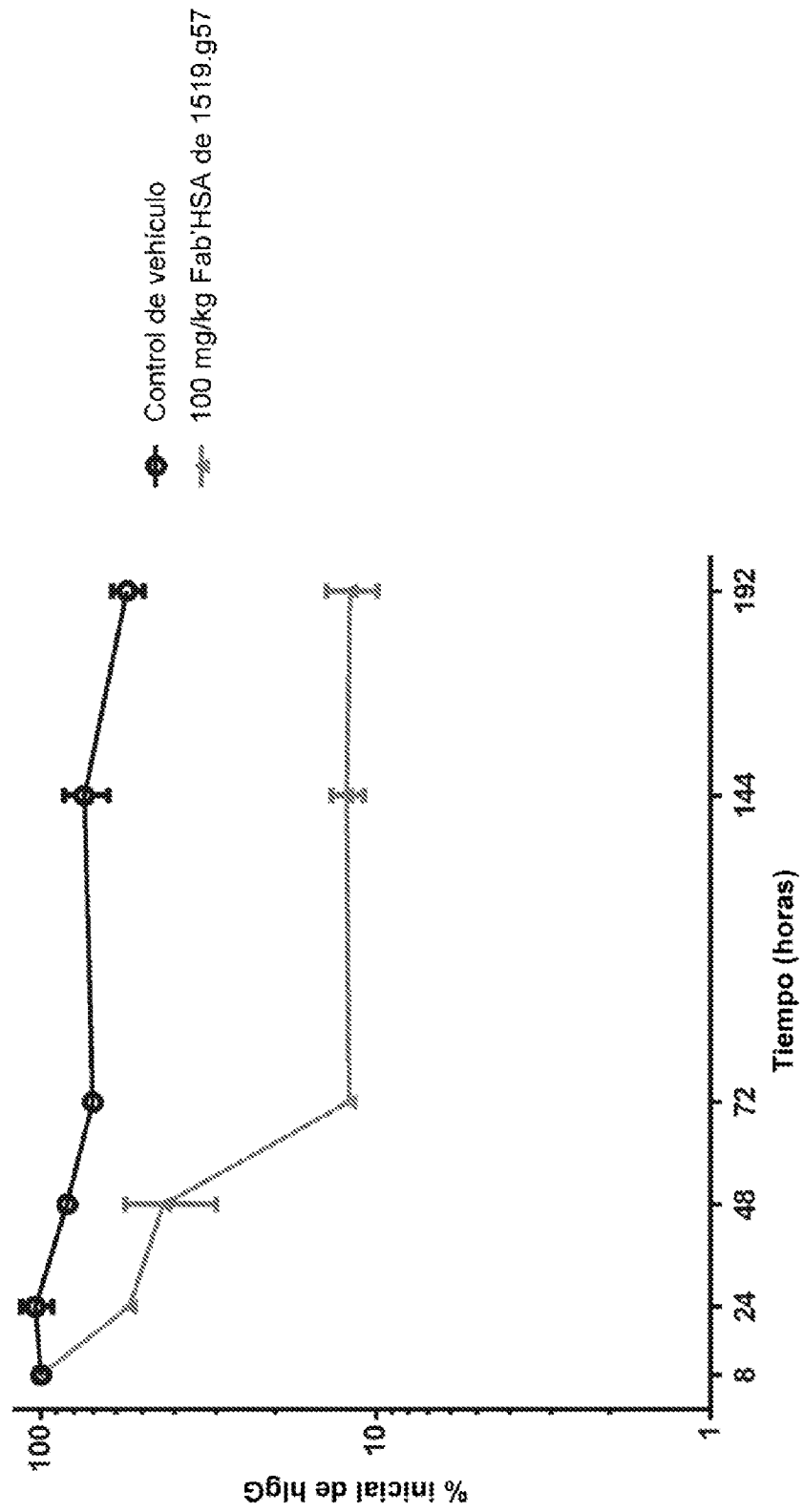


Figura 23 Aclaramiento aumentado de hIgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con Fab'Fv de CA170_01519.g57 o PBS IV

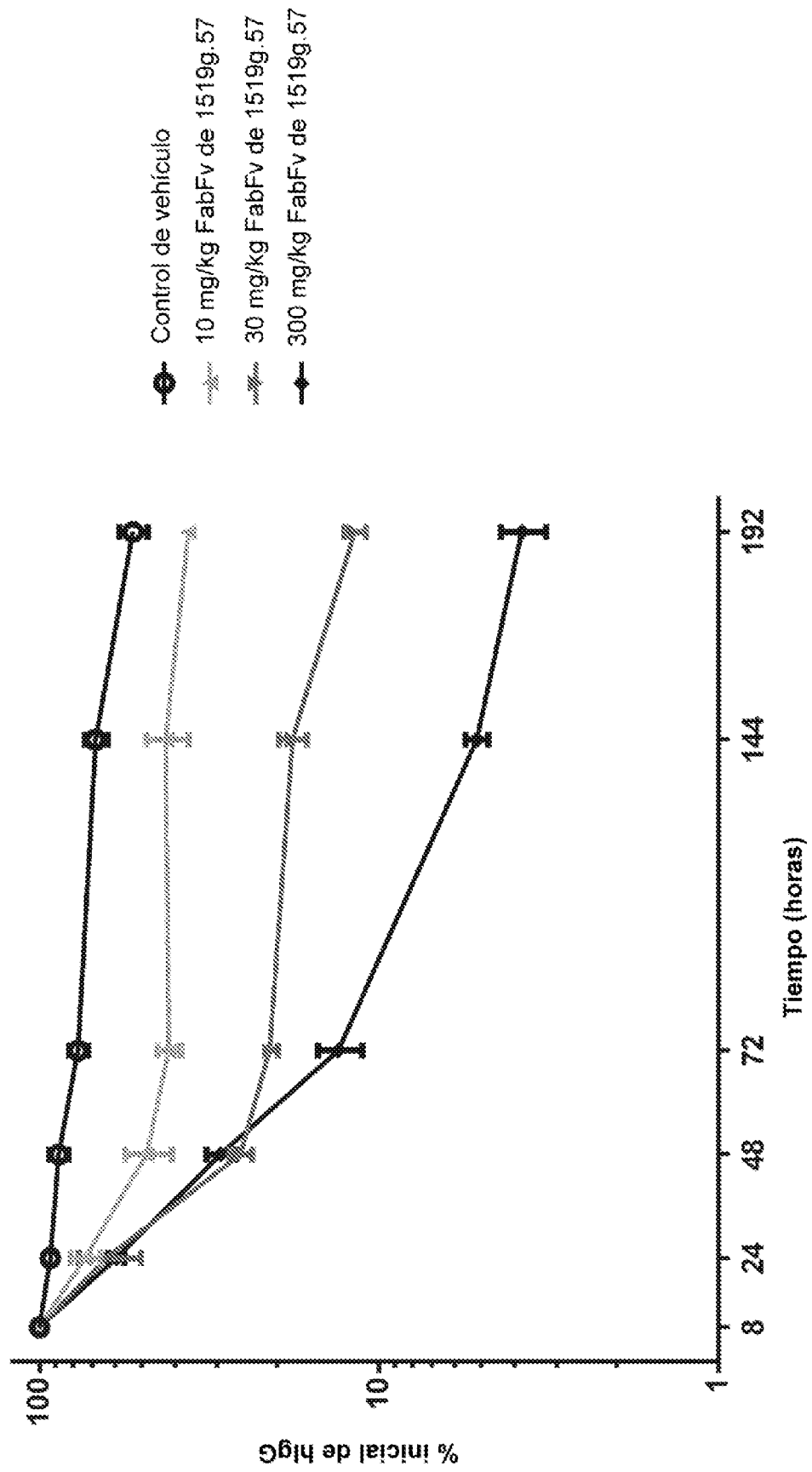


Figura 24 Aclaramiento aumentado de hlgG IV en plasma de ratones transgénicos hFcRn tratados con Fab o Fab'PEG de CA170_01519.g57 o PBS IV

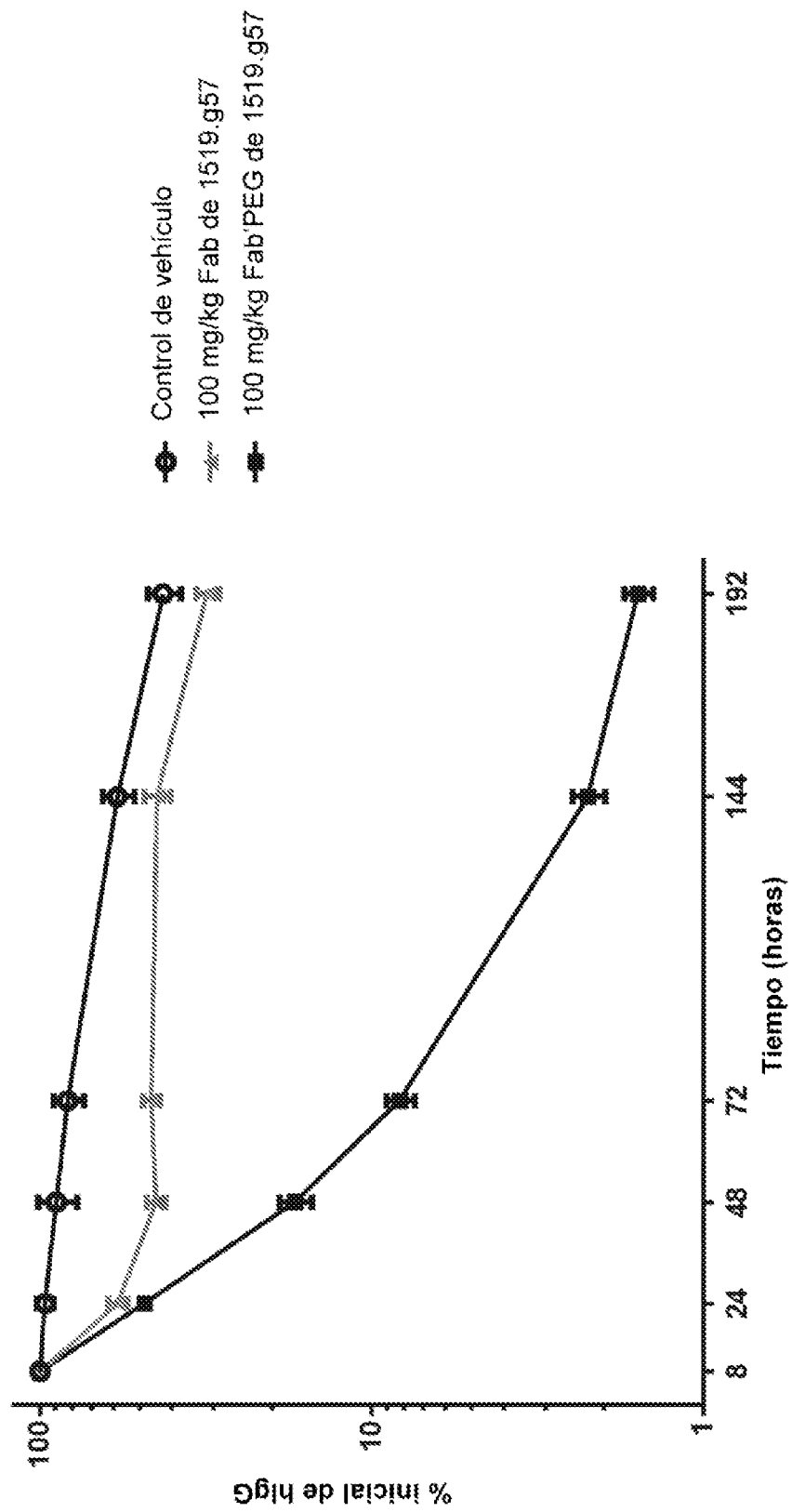


Figura 25

