(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 633 597**

(51) Int. CI.:

C07K 16/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2011 PCT/JP2011/001888**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11122011**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11714860 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2552955**

(54) Título: **Anticuerpos con afinidad modificada para FcRn que promueven la eliminación del antígeno**

(30) Prioridad:

09.11.2010 JP 2010250830
30.03.2010 JP 2010079667

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

IGAWA, TOMOYUKI;
ISHII, SHINYA;
MAEDA, ATSUHIKO y
NAKAI, TAKASHI

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 con afinidad modificada para FcRn que promueven la eliminación del antígeno

Campo técnico

La presente descripción proporciona:

procedimientos para facilitar la captación de antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células;

procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única;

procedimientos para mejorar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de moléculas de unión al antígeno;

procedimientos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno;

procedimientos para reducir la concentración de antígeno total o libre en plasma;

moléculas de unión al antígeno que aumentan la captación de antígeno en las células;

moléculas de unión al antígeno que tienen un número aumentado de antígenos de unión;

moléculas de unión al antígeno capaces de aumentar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas;

moléculas de unión al antígeno con mejora de la farmacocinética;

composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión al antígeno;

procedimientos para producir lo descrito anteriormente; y similares.

Antecedentes de la técnica

Los anticuerpos están llamando la atención como productos farmacéuticos ya que son altamente estables en el plasma y tienen pocos efectos secundarios. En la actualidad, hay disponibles en el mercado una serie de productos farmacéuticos de anticuerpos de tipo IgG y actualmente se están desarrollando muchos productos farmacéuticos de anticuerpos (NPL 1 y 2). Entretanto, se han dado a conocer diversas tecnologías aplicables a productos farmacéuticos de anticuerpos de segunda generación, que incluyen las que mejoran la función efectora, capacidad de unión al antígeno, farmacocinética y estabilidad, y las que reducen el riesgo de inmunogenicidad (NPL 3). En general, la dosis requerida de un producto farmacéutico de anticuerpo es muy alta. Esto, a su vez, ha conducido a problemas, tales como el alto coste de producción, así como la dificultad en la producción de formulaciones subcutáneas. En teoría, la dosis de un producto farmacéutico de anticuerpo se puede reducir mediante la mejora de la farmacocinética de anticuerpos o mejora de la afinidad entre anticuerpos y antígenos.

La bibliografía ha dado a conocer procedimientos para mejorar la farmacocinética de anticuerpos usando sustitución artificial de aminoácidos en regiones constantes (NPL 4 y 5). De forma similar, se ha dado a conocer la maduración por afinidad como una tecnología para aumentar la capacidad de unión al antígeno o la actividad neutralizante del antígeno (NPL 6). Esta tecnología permite el aumento de la actividad de unión al antígeno mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en la región CDR de una región variable o similar. La mejora de la capacidad de unión al antígeno permite la mejora de la actividad biológica in vitro o la reducción de dosificación, y permite además la mejora de la eficiencia in vivo (NPL 7).

La capacidad neutralizante de antígeno de una molécula de anticuerpo única depende de su afinidad. Mediante el aumento de la afinidad, un antígeno puede ser neutralizado por una cantidad menor de un anticuerpo. Se pueden usar diversos procedimientos para mejorar la afinidad de anticuerpos (NPL 6). Además, si la afinidad se pudiera hacer infinita por unión covalente del anticuerpo al antígeno, una molécula de anticuerpo única podría neutralizar una molécula de antígeno (un anticuerpo divalente puede neutralizar dos moléculas de antígeno). Sin embargo, la neutralización estequiométrica de un anticuerpo contra un antígeno (un anticuerpo divalente contra dos antígenos) es el límite de los procedimientos preexistentes, y por lo tanto es imposible neutralizar completamente el antígeno con menor cantidad de anticuerpo que la cantidad de antígeno. En otras palabras, el efecto potenciador de afinidad tiene un límite (NPL 9). Para prolongar el efecto de neutralización de un anticuerpo neutralizante durante un cierto período, el anticuerpo se debe administrar a una dosis mayor que la cantidad de antígeno producido en el cuerpo durante el mismo período. Con la mejora de la farmacocinética del anticuerpo o de la tecnología de maduración por afinidad sola descrita anteriormente, existe por tanto una limitación en la reducción de la dosis de anticuerpo requerida. Por consiguiente, para mantener el efecto neutralizante de antígenos del anticuerpo durante un período deseado con menor cantidad del anticuerpo que la cantidad de antígeno, un anticuerpo único debe neutralizar múltiples antígenos. Recientemente se ha descrito un anticuerpo que se une a un antígeno de una manera

dependiente del pH como un nuevo procedimiento para lograr el objetivo anterior (PTL1). Los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH, que se unen fuertemente a un antígeno en condiciones neutras en el plasma y se disocian del antígeno en condiciones ácidas en el endosoma, se pueden disociar del antígeno en el endosoma. Cuando un anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH se disocia del antígeno se recicla al plasma por FcRn, se puede unir de nuevo a otro antígeno. De este modo, un anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH se puede unir a varios antígenos repetidamente.

Además, la retención plasmática de un antígeno es muy corta en comparación con anticuerpos reciclados a través de la unión a FcRn. Cuando un anticuerpo con tal retención plasmática prolongada se une al antígeno, el tiempo de retención en plasma del complejo antígeno-anticuerpo se prolonga al mismo tiempo que el del anticuerpo. Por lo tanto, la retención plasmática del antígeno se prolonga mediante la unión al anticuerpo, y por lo tanto se incrementa concentración de antígeno de plasma.

El anticuerpo IgG tiene un tiempo de retención plasmática más prolongado como resultado de la unión a FcRn. La unión entre IgG y FcRn solo se observa en condiciones ácidas (pH 6,0). Por el contrario, la unión es casi indetectable en una condición neutra (pH 7,4). El anticuerpo IgG es captado en las células de una manera no específica. El anticuerpo retorna a la superficie celular por unión a FcRn endosómico en la condición endosómica ácida, y luego se disocia de FcRn en la condición plasmática neutra. Cuando se pierde la unión FcRn en la condición ácida mediante la introducción de mutaciones en el dominio Fc de IgG, la ausencia de reciclado de anticuerpos al plasma procedente del endosoma afecta notablemente el tiempo de retención del anticuerpo en el plasma. Un procedimiento informado para mejorar la retención plasmática del anticuerpo IgG es mejorar la unión de FcRn en condiciones ácidas. Las mutaciones de aminoácidos se introducen en el dominio Fc del anticuerpo IgG para mejorar la unión de FcRn en condiciones ácidas. Esto aumenta la eficiencia del reciclado al plasma desde el endosoma, lo que produce una mejora de la retención plasmática. Un requerimiento importante en las sustituciones de aminoácidos no es aumentar la unión de FcRn en condiciones neutras. Si un anticuerpo IgG se une a FcRn en condiciones neutras, el anticuerpo que retorna a la superficie celular mediante la unión a FcRn en la condición endosómica ácida no se disocia de FcRn en la condición plasmática neutra. En este caso, la retención plasmática se pierde bastante porque el anticuerpo IgG no se recicla al plasma. Por ejemplo, como se describe en J Immunol. (2002) 169 (9): 5171-80, un anticuerpo IgG1 modificado mediante la introducción de subestaciones de aminoácidos de manera que el anticuerpo resultante es capaz de unirse a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) se observó que presentaba una retención plasmática muy pobre cuando se administra a ratones. Además, como se describe en J Immunol. (2009) 182 (12): 7663 - 71; J Biol Chem. 2007 19 de enero; 282 (3): 1709 - 17; y J Immunol. 2002 1 de noviembre; 169 (9): 5171-80, se ha modificado un anticuerpo IgG1 mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos de manera que el anticuerpo resultante presenta una unión FcRn humana mejorada en condiciones ácidas (pH 6,0) y al mismo tiempo es capaz de unirse a FcRn humano en una condición neutra (pH 7,4). Se informó que el anticuerpo resultante no mostraba mejoría ni alteración en la retención plasmática cuando se administró a monos cynomolgus. Por lo tanto, la tecnología de manipulación genética de anticuerpos para mejorar las funciones de anticuerpos solo se ha centrado en la mejora de la retención plasmática de anticuerpos mediante el aumento de la unión de FcRn humano en condiciones ácidas sin aumentarla en condiciones neutras (pH 7,4). Hasta la fecha, no hay ningún informe que describa la ventaja de mejorar la unión de FcRn humano en condiciones neutras (pH 7,4) mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos en el dominio Fc de un anticuerpo IgG. Incluso si se mejora la afinidad antigénica del anticuerpo, no se puede mejorar la eliminación del antígeno del plasma. Se ha informado de que los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH descritos anteriormente son más efectivos como un procedimiento para aumentar la eliminación de antígenos del plasma en comparación con anticuerpos típicos (PTL 1).

De este modo, un anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH único se une a varios antígenos y es capaz de facilitar la eliminación del antígeno del plasma en comparación con los anticuerpos típicos. Por consiguiente, los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH tienen efectos no logrados por anticuerpos típicos. Sin embargo, hasta la fecha, no hay ningún informe sobre los procedimientos manipulación genética de anticuerpos para mejorar aún más la capacidad de los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH para unirse repetidamente a los antígenos y el efecto de aumentar la eliminación del antígeno del plasma.

Los documentos de la técnica anterior relacionados con la presente descripción se muestran a continuación:

Lista de citas

Bibliografía de patente

[PTL 1] WO 2009/125825, ANTIGEN-BINDING MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO TWO OR MORE ANTIGEN MOLECULES REPEATEDLY

Bibliografía no de patente

[NPL 1] Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073-1078 (2005)

[NPL 2] Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. Abril de 2005;

59(3): 389-96

[NPL 3] Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 31 de agosto de 2005; 20(1): 17-29. Revisión

[NPL 4] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J Immunol. 1 de enero de 2006; 176(1): 346-56

[NPL 5] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. Julio de 1997; 15(7): 637-40

[NPL 6] Proc Natl Acad Sci USA. 14 de junio de 2005; 102(24): 8466-71. Epub 6 de junio de 2005. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R

[NPL 7] Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. J Mol Biol. (2007) 368: 652-665

[NPL 8] Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications. Curr Opin Biotechnol. Diciembre de 2005; 16(6): 631-6

[NPL 9] Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochem Biophys Res Commun. 9 de septiembre de 2005; 334(4): 1004-13

Compendio

Problema técnico

Un objetivo de la presente descripción es proporcionar procedimientos para facilitar la captación de antígeno en las células mediante el uso de moléculas de unión al antígeno, procedimientos para aumentar el número de antígenos a los cuales se puede unir una molécula de unión al antígeno única, procedimientos para aumentar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno, procedimientos para mejorar la farmacocinética de moléculas de unión al antígeno, moléculas de unión al antígeno que facilitan la captación de antígenos en las células, moléculas de unión al antígeno que tienen un aumento del número de antígenos de unión, moléculas de unión al antígeno capaces de aumentar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de, moléculas de unión al antígeno con mejor farmacocinética, composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión al antígeno, y procedimientos para producir lo descrito anteriormente.

Solución al problema

Los presentes inventores llevaron a cabo estudios dedicados sobre procedimientos para facilitar la captación de antígeno en células a través de moléculas de unión al antígeno (moléculas, tales como polipéptidos, que tienen capacidad de unión al antígeno), procedimientos para permitir que moléculas de unión al antígeno se unan repetidamente a antígenos, procedimientos para mejorar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno, y procedimientos para mejorar la retención plasmática de las moléculas de unión al antígeno. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que las moléculas de unión al antígeno que tienen capacidad de unión a FcRn humano al pH endosómico temprano y una actividad de unión a FcRn humana mayor que la de la inmunoglobulina de tipo IgG humana intacta al pH del plasma podrían facilitar la captación de antígeno en las células. Los presentes inventores también descubrieron que la captación de antígeno mediada por moléculas de unión a antígeno en las células se puede aumentar adicionalmente y el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión a antígeno única se puede aumentar usando una molécula de unión a antígeno que tiene una actividad de unión al antígeno más débil al pH endosómico temprano que al pH del plasma; la reducción de la concentración de antígeno en plasma puede aumentar mediante la administración de tal molécula de unión al antígeno; y se puede mejorar la farmacocinética de una molécula que se une al antígeno.

La invención se refiere a las realizaciones definidas en las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5 y a pH 7,0 y una actividad de unión al antígeno menor a pH 5,5 que a pH 7,0, donde la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 °C es mayor que KD 3,2 μM, donde el dominio de unión a FcRn humano es un dominio Fc resultante de la sustitución de al menos un aminoácido en el dominio Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana por un aminoácido diferente. En una realización particular, la invención proporciona tal anticuerpo donde la relación de actividad de unión al antígeno a pH 5,5 y a pH 7,0 es al menos 2 en el valor de KD (a pH 5,5)/KD (a pH 7,0).

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que tiene un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5 y a pH 7,0 y una actividad de unión al antígeno menor a pH 5,5 que a pH 7,0, donde la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 es mayor que KD 3,2 μM, donde el dominio de unión a FcRn humano es un dominio Fc resultante de la sustitución de al menos un aminoácido en el dominio Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana por un aminoácido diferente.

La invención además se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo, tal procedimiento comprende las etapas de: (a) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte a pH 7,0 que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano del anticuerpo que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5; (b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo y seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno mayor a pH 7,0 que a pH 5,5; (c) obtener un gen que codifica un anticuerpo en que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) y (b) están ligados; y (d) producir un anticuerpo usando el gen preparado en (c). La invención también proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo, tal procedimiento comprende las etapas de (a) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte a pH 7,0 que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano del anticuerpo que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5; (b) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno mayor a pH 7,0 que a pH 5,5; (c) obtener un gen que codifica un anticuerpo en que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparados en (a) y (b) están ligados; y (d) producir un anticuerpo usando el gen preparado en (c). En forma adicional, la invención proporciona un procedimiento para la detección de un anticuerpo, tal procedimiento comprende las etapas de (a) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte a pH 7,0 que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano del anticuerpo que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5; y (b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo y seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno mayor a pH 7,0 que a pH 5,5.

Adicionalmente, la presente descripción proporciona:

procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única;

procedimientos para aumentar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno;

procedimientos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno;

procedimientos para reducir la concentración de antígeno total o libre en plasma;

moléculas de unión al antígeno que mejoran la captación del antígeno en las células;

moléculas de unión al antígeno que tienen un número aumentado de antígenos de unión;

moléculas de unión al antígeno capaces de aumentar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas;

moléculas de unión al antígeno con mejor farmacocinética;

composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión al antígeno;

procedimientos para producir lo descrito anteriormente; y similares. Más específicamente, la presente descripción proporciona:

[1] una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro, donde la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es mayor que 3,2 micromolar;

[2] una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es 28 veces mayor que una IgG humana intacta;

[3] una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro es mayor que 2,3 micromolar;

[4] una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es 38 veces mayor que una IgG humana intacta;

[5] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [4], donde el intervalo de pH neutro es pH 7,0 a 8,0;

[6] una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano en el que una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano es más baja que una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia al animal no humano que comprende el mismo dominio de unión al antígeno y dominio Fc de IgG humana intacta que un dominio de unión a FcRn humano;

[7] una molécula de unión al antígeno en que una concentración de antígeno en plasma después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano es más bajo que una concentración de antígeno total en plasma obtenida del animal no humano al que no se administra la molécula de unión al antígeno;

[8] una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano donde una relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno (C) de la molécula de unión al antígeno calculada de la siguiente manera;

$$C = A/B,$$

es más baja que una relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno (C') de una molécula de unión al antígeno que comprende el mismo dominio de unión al antígeno y dominio Fc de IgG humana intacta que un dominio de unión a FcRn humano que se calcula de la siguiente manera;

$$C'=A'/B',$$

donde;

A es una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano,

B es una concentración plasmática de una molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano,

A' es una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia al animal no humano,

B' es una concentración plasmática de una molécula de unión al antígeno después de la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia al animal no humano;

[9] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [6] a [8], donde el animal no humano es un ratón transgénico que expresa FcRn humano;

[10] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [6] a [9], donde la concentración de antígeno en plasma es una concentración de antígeno total a largo plazo en plasma;

[11] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [6] a [9], donde la concentración de antígeno en plasma es una concentración de antígeno total a corto plazo en plasma;

[12] una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro, donde la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es mayor que el de una IgG humana intacta;

[13] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [11], donde una actividad de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido es menor que el del intervalo de pH neutro;

[14] la molécula de unión al antígeno del punto [12] o [13], donde la relación de actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido y intervalo de pH neutro es al menos 2 en el valor de KD (en el intervalo de pH ácido)/KD (en el intervalo de pH neutro);

[15] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [12] a [14], que comprende una mutación de aminoácido del dominio de unión al antígeno, que comprende una sustitución de al menos un aminoácido del dominio de unión al antígenopor histidina o la inserción de al menos una histidina;

[16] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [12] a [14], donde el dominio de unión al antígeno se obtiene de la biblioteca del dominio de unión al antígeno;

[17] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [16], que comprende como el dominio de unión a FcRn humano un dominio Fc resultante de la sustitución de al menos un aminoácido en el dominio Fc de la

IgG original por un aminoácido diferente;

[18] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [17], donde el dominio de unión a FcRn humano es un dominio de unión a FcRn humano que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original por un aminoácido diferente;

[19] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [18], que comprende un dominio de unión a FcRn humano que comprende sustitución de aminoácidos en el dominio Fc de IgG original que comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada de:

una sustitución de aminoácido de Gly por Met en la posición 237;

una sustitución de aminoácido de Pro por Ala en la posición 238;

una sustitución de aminoácido de Ser por Lys en la posición 239;

una sustitución de aminoácido de Lys por Ile en la posición 248;

una sustitución de aminoácido de Thr por Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 250;

una sustitución de aminoácido Met por Phe, Trp, o Tyr en la posición 252;

una sustitución de aminoácido de Ser por Thr en la posición 254;

una sustitución de aminoácido de Arg por Glu en la posición 255;

una sustitución de aminoácido de Thr por Asp, Glu, o Gln en la posición 256;

una sustitución de aminoácido de Pro por Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, o Val en la posición 257;

una sustitución de aminoácido Glu por His en la posición 258;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala en la posición 265;

una sustitución de aminoácido Asp por Phe en la posición 270;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala, o Glu en la posición 286;

una sustitución de aminoácido Thr por His en la posición 289;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala en la posición 297;

una sustitución de aminoácido Ser por Gly en la posición 298;

una sustitución de aminoácido Val por Ala en la posición 303;

una sustitución de aminoácido Val por Ala en la posición 305;

una sustitución de aminoácido Thr por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 307;

una sustitución de aminoácido Val por Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, o Thr en la posición 308;

una sustitución de aminoácido Leu o Val por Ala, Asp, Glu, Pro, o Arg en la posición 309;

una sustitución de aminoácido Gln por Ala, His, o Ile en la posición 311;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala o His en la posición 312;

una sustitución de aminoácido Leu por Lys o Arg en la posición 314;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala o His en la posición 315;

una sustitución de aminoácido Lys por Ala en la posición 317;

una sustitución de aminoácido Asn por Gly en la posición 325;

una sustitución de aminoácido Ile por Val en la posición 332;

una sustitución de aminoácido Lys por Leu en la posición 334;

una sustitución de aminoácido Lys por His en la posición 360;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala en la posición 376;

una sustitución de aminoácido Glu por Ala en la posición 380;

una sustitución de aminoácido Glu por Ala en la posición 382;

una sustitución de aminoácido Asn o Ser por Ala en la posición 384;

una sustitución de aminoácido Gly por Asp o His en la posición 385;

una sustitución de aminoácido Gln por Pro en la posición 386;

una sustitución de aminoácido Pro por Glu en la posición 387;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala o Ser en la posición 389;

una sustitución de aminoácido Ser por Ala en la posición 424;

una sustitución de aminoácido Met por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, o Tyr en la posición 428;

una sustitución de aminoácido His por Lys en la posición 433;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala, Phe, His, Ser, Trp, o Tyr en la posición 434;

y una sustitución de aminoácido Tyr por His o Phe en la posición 436 en la numeración EU;

[20] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [18], cuyo dominio de unión a FcRn humano comprende al menos un aminoácido seleccionado de:

Met en la posición de aminoácido 237;

Ala en la posición de aminoácido 238;

Lys en la posición de aminoácido 239;

Ile en la posición de aminoácido 248;

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

Phe, Trp, o Tyr en la posición de aminoácido 252;

Thr en la posición de aminoácido 254;

Glu en la posición de aminoácido 255;

Asp, Glu, o Gln en la posición de aminoácido 256;

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

His en la posición de aminoácido 258;

Ala en la posición de aminoácido 265;

Phe en la posición de aminoácido 270;

Ala o Glu en la posición de aminoácido 286;

His en la posición de aminoácido 289;

Ala en la posición de aminoácido 297;

Gly en la posición de aminoácido 298;

Ala en la posición de aminoácido 303;

Ala en la posición de aminoácido 305;

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

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

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

Ala, His, o Ile en la posición de aminoácido 311;

Ala o His en la posición de aminoácido 312;

Lys o Arg en la posición de aminoácido 314;

Ala o His en la posición de aminoácido 315;

Ala en la posición de aminoácido 317;

Gly en la posición de aminoácido 325;

Val en la posición de aminoácido 332;

Leu en la posición de aminoácido 334;

His en la posición de aminoácido 360;

Ala en la posición de aminoácido 376;

Ala en la posición de aminoácido 380;

Ala en la posición de aminoácido 382;

Ala en la posición de aminoácido 384;

Asp o His en la posición de aminoácido 385;

Pro en la posición de aminoácido 386;

Glu en la posición de aminoácido 387;

Ala o Ser en la posición de aminoácido 389;

Ala en la posición de aminoácido 424;

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

Lys en la posición de aminoácido 433;

Ala, Phe, His, Ser, Trp, o Tyr en la posición de aminoácido 434;

e His o Phe en la posición de aminoácido 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original;

[21] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [18] a [20], donde la IgG original se selecciona de una IgG obtenida de un animal no humano;

[22] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [18] a [20], donde la IgG original es una IgG humana;

[23] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [22], que tiene una actividad antagonista;

[24] la molécula de unión al antígeno del punto [1] a [23], que se une a un antígeno de membrana o antígeno soluble;

[25] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [24], donde el dominio de unión al antígeno comprende un ligando artificial que se une a un receptor;

[26] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [24], donde el dominio de unión al antígeno comprende un receptor artificial que se une a un ligando;

[27] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de los puntos [1] a [24], que es un anticuerpo;

[28] la molécula de unión al antígeno del punto [27], donde el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o anticuerpo humano;

[29] una composición farmacéutica que comprende cualquiera de la molécula de unión al antígeno del punto [1] a [28];

[30] un procedimiento para facilitar la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en una célula mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[31] un procedimiento para facilitar la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en una célula mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[32] un procedimiento para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[33] un procedimiento para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[34] un procedimiento para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno para eliminar un antígeno del plasma mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[35] un procedimiento para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno para eliminar un antígeno del plasma mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[36] un procedimiento para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[37] un procedimiento para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[38] un procedimiento para facilitar la disociación intracelular de un antígeno unido a una molécula de unión al antígeno fuera de la célula de la molécula de unión al antígeno, mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[39] un procedimiento para facilitar la liberación extracelular de la forma libre de antígeno de una molécula de unión al antígeno captada en una célula en una forma unida a antígeno, mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[40] un procedimiento para reducir la concentración de antígeno en plasma total o libre en plasma, mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[41] un procedimiento para reducir la concentración de antígeno en plasma total o libre en plasma, mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y reducción de su actividad de unión

al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, y tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

[42] el procedimiento de cualquiera de los puntos [30] a [41], donde el intervalo de pH ácido es pH 5,5 a pH 6,5 y el intervalo de pH neutro es pH 7,0 a pH 8,0;

[43] el procedimiento de cualquiera de los puntos [30] a [41], donde el aumento en la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es un aumento mediante la sustitución de al menos un aminoácido en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano por un aminoácido diferente ;

[44] el procedimiento de cualquiera de los puntos [30] a [41], donde el aumento en la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es un aumento mediante la sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano por un aminoácido diferente;

[45] El procedimiento de cualquiera de los puntos [31], [33], [35], [37] a [39], y [41], donde la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido se reduce a menos de la del intervalo de pH neutro mediante la sustitución de al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina o inserción de la menos una histidina;

[46] El procedimiento de cualquiera de los puntos [31], [33], [35], [37] a [39], y [41], donde el dominio de unión al antígeno se obtiene de biblioteca del dominio de unión al antígeno;

[47] el procedimiento de cualquiera de los puntos [31], [33], [35], [37] a [39], y [41], donde la disminución en la actividad de unión al antígeno está representada por un aumento en el valor de KD (en el intervalo de pH ácido) /KD (en el intervalo de pH neutro) que es una relación de actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido y intervalo de pH neutro, con respecto a antes de la sustitución por o inserción de histidina;

[48] un procedimiento para producir una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que 3,2 micromolar obtenida mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno;

(b) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) están ligados; y

(c) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (b);

[49] un procedimiento para producir una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

(b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno y seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno mayor en el intervalo de pH neutro que en el intervalo de pH ácido;

(c) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) y (b) están ligados; y

(d) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (c); y

[50] un procedimiento para producir una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

(b) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno mayor en el intervalo de pH neutro que en el intervalo de pH ácido;

(c) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en que un dominio de unión a FcRn humano y un

dominio de unión al antígeno preparados en (a) y (b) están ligados; y

(d) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (c);

[51] una molécula de unión al antígeno producida por el procedimiento de producción de cualquiera de los puntos [48] a [50];

[52] un procedimiento para la detección de una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que 3,2 micromolar obtenido mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno;

(b) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) están ligados; y

(c) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (b);

[53] un procedimiento para la detección de una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

(b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno y seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno mayor en el intervalo de pH neutro que en el intervalo de pH ácido;

(c) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en el que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) y (b) están ligados; y

(d) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (c);

[54] un procedimiento para la detección de una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

(b) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno mayor en el intervalo de pH neutro que en el intervalo de pH ácido;

(c) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en el que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) y (b) están ligados; y

(d) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (c);

[55] El procedimiento de cualquiera de los puntos [30] a [54], donde el dominio de unión al antígeno comprende un ligando artificial que se une a un receptor;

[56] el procedimiento de cualquiera de los puntos [30] a [54], donde el dominio de unión al antígeno comprende un receptor artificial que se une a un ligando; y

[57] el procedimiento de cualquiera de los puntos [30] a [54], donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

Efectos ventajosos

La presente descripción proporciona:

procedimientos para facilitar la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células;

procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única; y procedimientos para aumentar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno. Cuando la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células está facilitada, la reducción de la concentración de antígeno en plasma se puede aumentar mediante la administración de tales moléculas de unión al antígeno, y la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno se puede mejorar para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de

unión al antígeno única. En consecuencia, las moléculas de unión al antígeno pueden producir efectos in vivo más superiores que las moléculas de unión al antígeno ordinarias.

Breve descripción de los dibujos

[fig.1] La Fig. 1 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble del receptor IL-6 humano después de la administración de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276) en que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano de forma soluble es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.2] La Fig. 2 es un diagrama esquemático que muestra que la disociación de la molécula de anticuerpo de IgG del antígeno soluble en el endosoma produce la mejora de la eliminación de antígeno, lo que lleva a una nueva ronda de unión a otro antígeno.

[fig.3] La Fig. 3 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma en ratones transgénicos que expresan FcRn humano.

[fig.4] La Fig. 4 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble de receptor IL-6 humano en ratones transgénicos que expresan FcRn humano.

[fig. 5] La Fig. 5 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma en ratones normales.

[fig.6] La Fig. 6 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble de receptor IL-6 humano en ratones normales.

[fig.7] La Fig. 7 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble no unida del receptor IL-6 humano en ratones normales.

[fig.8] La Fig. 8 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble de receptor IL-6 humano en ratones transgénicos que expresan FcRn humano.

[fig.9] La Fig. 9 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble de receptor IL-6 humano después de la administración de Fv4-IgG1-F14 a una dosis baja (0,01 mg/kg) o 1 mg/kg.

[fig.10] La Fig. 10 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma después de la administración de Fv4-IgG1-F14 a una dosis baja (0,01 mg/kg) o 1 mg/kg.

[fig.11] La Fig. 11 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble de receptor IL-6 humano después de la administración de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones normales en que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano de forma soluble es constante.

[fig.12] La Fig. 12 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276).

[fig.13] La Fig. 13 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la forma soluble de receptor IL-6 humano después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276).

[fig.14] La Fig. 14 describes la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc a FcRn humano a pH 7,0 y concentración de hsIL-6R plasmática en el día 1 después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276).

[fig.15] La Fig. 15 describes la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc a FcRn humano a pH 7,0 y concentración de anticuerpo en plasma en el día 1 después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276).

[fig.16] La Fig 16 describe el curso temporal de la relación molar de antígeno/anticuerpo (valor C) después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276).

[fig.17] La Fig. 17 describes la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc a FcRn humano a pH 7,0 y relación molar de antígeno/anticuerpo (valor C) en el día 1 después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276).

[fig.18] La Fig. 18 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de hsIL-6R después de la administración de Fv4-IgG1-F14 a dosis más bajas (0,01 o 0.2 mg/kg) o 1 mg/kg a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión

en estado estacionario).

[fig.19] La Fig. 19 describe el curso temporal de concentración de hsIL-6R plasmática en línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano y línea 32 después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276 y 32).

[fig.20] La Fig. 20 describes el curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma en la línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano y línea 32 después de la co-inyección de hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 276 y 32).

[fig.21] La Fig. 21 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de hsIL-6R después de la administración de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.22] La Fig. 22 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática del anticuerpo después de la administración de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.23] La Fig 23 describe los cursos temporales de relación molar de antígeno/anticuerpo (valor C) después de la administración de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.24] La Fig. 24 describe la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc a FcRn humano a pH 7,0 y la relación molar de antígeno/anticuerpo (valor C) en el día 1 después de la administración de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.25] La Fig. 25 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma después de la administración de anticuerpos anti-receptor IL-6 humano que tiene la variante de Fc de F11, F39, F48, y F264 a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.26] La Fig. 26 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de hsIL-6R después de la administración de anticuerpos anti-receptor IL-6 humano que tiene la variante de Fc de F11, F39, F48, y F264 a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.27] La Fig. 27 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma después de la administración de anticuerpos anti-receptor IL-6 humano que tiene la variante de Fc de F157, F196, y F262 a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.28] La Fig. 28 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de hsIL-6R después de la administración de anticuerpos anti-receptor IL-6 humano que tiene la variante de Fc de F157, F196, y F262 a ratones transgénicos que expresan FcRn humano (línea 32) en que la concentración plasmática de hsIL-6R es constante (modelo de infusión en estado estacionario).

[fig.29] La Fig. 29 describe un modelo farmacocinético usado para el estudio in silico de anticuerpo convencional y anticuerpo eliminador de antígeno.

[fig.30] La Fig. 30 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la IL-6 humana después de la co-inyección de IL-6 humana y anticuerpo anti-IL-6 humana a ratón normal.

[fig.31] La Fig. 31 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática del anticuerpo después de la co-inyección de IL-6 humana y anticuerpo anti-IL-6 humana a ratón normal.

[fig.32] La Fig. 32 muestra un sensorgrama de IgA humana que se une a proteína de fusión de CD89-Fc a pH 7.4 y pH 6,0 usando Biacore.

[fig.33] La Fig. 33 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática de la IgA humana después de la co-inyección de IgA humana y proteína de fusión de CD89-Fc a ratón normal.

[fig.34] La Fig. 34 muestra en un gráfico un curso temporal de concentración plasmática del anticuerpo después de la co-inyección de IgA humana y proteína de fusión de CD89-Fc a ratón normal.

[fig.35] La Fig. 35 muestra en un gráfico de concentración plasmática de la plexina A1 humana soluble 7 horas después de la co-inyección de plexina A1 humana soluble y anticuerpo anti- plexina A1 humana a ratón normal.

Descripción de realizaciones

La presente descripción proporciona procedimientos para facilitar la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células. Más específicamente, la presente descripción proporciona procedimientos para facilitar la captación de antígeno en las células por una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, los que se basan en el aumento de la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para mejorar la captación de antígeno en las células mediante una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, que se basan en la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno.

La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la captación de antígeno en las células por una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, los cuales se basan en el uso de un dominio de unión a FcRn humano que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano que comprende el dominio Fc de la IgG original por un aminoácido diferente.

La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células, mediante la reducción de la actividad de unión al antígeno (capacidad de unión) en el intervalo de pH ácido de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente a menos de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro; y esto facilita la captación de antígeno en las células. La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células, los cuales se basan en la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente que facilita la captación de antígeno en las células. La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células, los cuales se basan en la sustitución de al menos un aminoácido por histidina o la inserción de al menos una histidina en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente que facilita la captación de antígeno en las células.

En la presente memoria, "la captación de antígeno en las células" mediada por una molécula de unión al antígeno significa que los antígenos son captados en células por endocitosis. Mientras tanto, en la presente memoria,"facilitar la captación en las células" significa que se aumenta la velocidad de captación intracelular de molécula de unión al antígeno unido a un antígeno en el plasma y/o se reduce la cantidad de reciclado del antígeno captado en el plasma. Esto significa que la velocidad de captación en las células está facilitada en comparación con la molécula de unión al antígeno antes de aumentar la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro, o antes de aumentar la actividad de unión a FcRn humano y reducir la actividad de unión al antígeno (capacidad de unión) de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. Con preferencia esta tasa se mejora en comparación con la IgG humana intacta, y con más preferencia en comparación con IgG humana intacta. En consecuencia, en la presente descripción, se puede evaluar si la captación de antígeno en las células está facilitada por una molécula de unión al antígeno sobre la base de un aumento en la velocidad de captación de antígeno en las células. La velocidad de captación de antígeno en las células se puede calcular, por ejemplo, mediante el control a lo largo del tiempo de la reducción de la concentración de antígeno en el medio de cultivo que contiene células que expresan FcRn humano después de añadir el antígeno y la molécula de unión al antígeno al medio, o controlar a lo largo del tiempo la cantidad de captación de antígeno en células que expresan FcRn humano. Usando los procedimientos de la presente descripción para facilitar la velocidad de captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células, por ejemplo, la velocidad de eliminación de antígeno del plasma se puede mejorar mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno. En consecuencia, también se puede evaluar si se facilita la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células, por ejemplo, mediante el análisis de si se acelera la velocidad de eliminación de antígeno de plasma está acelerada o si se reduce la concentración de antígeno total en plasma mediante la administración de una molécula de unión al antígeno.

En la presente memoria, "concentración de antígeno total en plasma" significa la suma de la concentración de antígeno unido y antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno, o "concentración de antígeno libre en plasma" que es la concentración de antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno. Varios procedimientos para medir la "concentración de antígeno total en plasma" o "concentración de antígeno libre en plasma" son bien conocidos en la técnica como se describe de aquí en adelante en la presente memoria.

"IgG humana intacta" como se usa en la presente significa una IgG humana no modificada y no se limita a una clase específica de IgG. Esto significa que IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana se pueden usar como "IgG humana intacta" siempre que se pueda unir al FcRn humano en el intervalo de pH ácido. Con preferencia, "IgG humana intacta" puede ser IgG1 humana.

La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se

puede unir una molécula de unión al antígeno única. Más específicamente, la presente descripción proporciona procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, mediante el aumento de la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno.

La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, mediante el uso de un dominio de unión a FcRn humano que comprende una secuencia de aminoácidos en que al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano que comprende un dominio Fc de IgG original está sustituido con un aminoácido diferente.

"IgG original" tal como se usa en la presente significa una IgG no modificada que se modifica posteriormente para generar una variante siempre que una variante modificada de IgG original se pueda unir a FcRn humano en el intervalo de pH ácido (por lo tanto, la IgG original no requiere necesariamente actividad de unión a FcRn humano en la condición ácida). La IgG original puede ser una IgG natural, o una variante o una versión manipulada genéticamente de una IgG de origen natural. La IgG original se puede referir al propio polipéptido, composiciones que comprenden la IgG original, o la secuencia de aminoácidos que la codifica. Cabe señalar que la "IgG original" incluye IgG comercialmente conocida, producida de manera recombinante, como se describe a continuación. El origen de la "IgG original" no está limitado y se puede obtener de cualquier organismo de animales no humanos o humanos. Con preferencia, el organismo se selecciona de ratón, rata, conejillo de indias, hámster, gerbo, gato, conejo, perro, cabra, oveja, vaca, caballo, camello y primate no humano. En otra realización, la "IgG original" también se puede obtener a partir de cynomologous, tití, rhesus, chimpancé o ser humano. Con preferencia, la "IgG original" se obtiene a partir de IgG1 humana pero no se limita a una clase específica de IgG. Esto significa que las IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas se pueden usar apropiadamente como "IgG original". De manera similar, cualquier clase o subclase de IgGs de cualquier organismo anteriormente versión manipulada genéticamente de una IgG natural se describe en. Curr Opin Biotechnol. Diciembre de 2009; 20(6): 685-91, Curr Opin Immunol. Agosto de 2008; 20(4): 460-70, Protein Eng Des Sel. Abril de 2010; 23(4): 195-202, WO 2009/086320, WO 2008/092117, WO 2007/041635 y WO 2006/105338, pero no se limitan a los mismos.

Además, la presente descripción proporciona procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única, mediante la reducción de la actividad de unión al antígeno (capacidad de unión) en el intervalo de pH ácido de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente que tiene un número amentado de eventos de unión al antígeno a menos de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única, mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente que tiene un número amentado de eventos de unión al antígeno. La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única, mediante la sustitución de al menos un aminoácido por histidina o la inserción de al menos una histidina en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente que tiene un número amentado de eventos de unión al antígeno.

En la presente memoria, el "número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única" significa el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única hasta que la molécula se elimina debido a la degradación. En la presente memoria, "aumento del número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única" significa un aumento en el número de ciclos obtenidos hasta que la molécula de unión al antígeno se elimina debido a la degradación, donde cada ciclo consiste en: la unión de un antígeno a la molécula de unión al antígeno en plasma, captación intracelular de la molécula de unión al antígeno unida al antígeno, y disociación del antígeno en el endosoma, seguido por el retorno de la molécula de unión al antígeno al plasma. Esto significa que el número de ciclos está aumentado en comparación con la molécula de unión al antígeno antes de aumentar la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro, o antes de aumentar la actividad de unión a FcRn humano y reducción de la actividad de unión al antígeno (capacidad de unión) de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. En consecuencia, se puede evaluar si el número de ciclos está aumentado mediante el análisis de si la "captación intracelular está facilitada" descrita anteriormente o si la "se mejora la farmacocinética" como se describe a continuación.

La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la disociación intracelular del antígeno de una molécula de unión al antígeno que se une al antígeno fuera de la célula. Más específicamente, la presente descripción proporciona procedimientos para facilitar la disociación intracelular del antígeno de una molécula de unión al antígeno que se une al antígeno fuera de la célula, mediante el aumento de la actividad de unión a FcRn

humano en el intervalo de pH neutro de la molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la disociación intracelular del antígeno de una molécula de unión al antígeno que se une al antígeno fuera de la célula, los cuales se basan en la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno y simultáneamente la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido. La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la disociación intracelular del antígeno de una molécula de unión al antígeno que se une al antígeno fuera de la célula, mediante la sustitución por histidina de al menos un aminoácido o inserción de al menos una histidina en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno y simultáneamente la sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano por un aminoácido diferente.

De acuerdo con la presente descripción, los antígenos se pueden disociar de la molécula de unión al antígeno en cualquier parte dentro de la célula; sien embargo, un sitio de disociación preferido es el endosoma temprano. En la presente memoria, "la disociación intracelular de un antígeno unido a una molécula de unión al antígeno fuera de la célula de la molécula de unión al antígeno" no significa necesariamente que todos los antígenos captados en las células por medio de la unión a la molécula de unión al antígeno se disocian de la molécula de unión al antígeno dentro de la célula. En consecuencia, es aceptable que la proporción de antígenos disociados de la molécula de unión al antígeno dentro de la célula esté aumentada en comparación con antes de la reducción de la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro y el aumento simultáneo de la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro. Tal procedimiento para facilitar la disociación intracelular del antígeno de una molécula de unión al antígeno unido al antígeno fuera de la célula es sinónimo de un procedimiento para conferir a una molécula de unión al antígeno una propiedad para facilitar la disociación intracelular del antígeno de la molécula de unión al antígeno mediante la facilitación de la captación de la molécula de unión al antígeno unida al antígeno.

La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la liberación extracelular de molécula de unión al antígeno libre de antígeno captada por las células en una forma unida a antígeno. Más específicamente, la presente descripción proporciona procedimientos para facilitar la liberación extracelular de molécula de unión al antígeno libre de antígeno captada en las células en una forma unida a antígeno, mediante el aumento de la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro de la molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido y reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la liberación extracelular de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno captada en las células en una forma unida a antígeno, los cuales se basan en la alteración de al menos un aminoácido en una molécula de unión al antígeno y la alteración simultánea de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano. La presente descripción también proporciona procedimientos para facilitar la liberación extracelular de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno captada en las células en una forma unida a antígeno, mediante la sustitución por histidina de al menos un aminoácido o la inserción de al menos una histidina en una molécula de unión al antígeno, y la sustitución simultánea de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389,424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano por un aminoácido diferente.

En la presente memoria, "la liberación extracelular de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno captada en las células en una forma unida a antígeno" no significa necesariamente que todas las moléculas de unión al antígeno unidas al antígeno captadas en las células se liberan de forma libre de antígeno fuera de la célula. Es aceptable que la proporción de moléculas de unión al antígeno liberadas en una forma libre de antígeno al exterior de la célula esté aumentada en comparación con antes de la reducción de la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro y aumento de la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro. La molécula de unión al antígeno liberada al exterior de la célula con preferencia retiene la actividad de unión al antígeno. Tal procedimiento para facilitar la liberación extracelular de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno captada en las células en una forma unida a antígeno es sinónimo de un procedimiento para conferir a una molécula de unión al antígeno una propiedad para facilitar la liberación extracelular de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno captada en las células en una forma unida a antígeno mediante la facilitación de la captación de las moléculas de unión al antígeno unidas al antígeno en las células.

La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar el antígeno plasmático mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno. En la presente descripción "procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar antígeno plasmático" es sinónimo de "procedimientos para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno para eliminar antígeno del plasma". Más específicamente, la presente descripción proporciona procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar

antígeno plasmático mediante una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, mediante el aumento de la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar antígeno plasmático mediante una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, los cuales se basan en la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno.

La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar antígeno plasmático mediante una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, mediante el uso de un dominio de unión a FcRn humano que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano que comprende el dominio Fc de IgG original por un aminoácido diferente.

La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar antígeno plasmático mediante una molécula de unión al antígeno, mediante la reducción de la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente con capacidad mejorada para eliminar antígeno plasmático en comparación con la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar antígeno plasmático mediante una molécula de unión al antígeno, mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente con capacidad mejorada para eliminar antígeno plasmático. La presente descripción también proporciona procedimientos para aumentar la capacidad para eliminar antígeno plasmático mediante la administración de una molécula de unión al antígeno, mediante la sustitución por histidina de al menos un aminoácido o la inserción de al menos una histidina en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente con capacidad mejorada para eliminar antígeno plasmático.

En la presente memoria, la "capacidad para eliminar antígeno plasmático" significa la capacidad para eliminar antígeno del plasma cuando las moléculas de unión al antígeno se administran o secretan in vivo. En consecuencia, el "aumento en la capacidad de la molécula de unión al antígeno para eliminar antígeno plasmático" en la presente significa que la velocidad de eliminación de antígeno del plasma se acelera después de la administración de la molécula de unión al antígeno en comparación con antes de aumentar la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro o antes de aumentar la actividad de unión a FcRn humano y la reducción simultánea de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro. El aumento en la actividad de una molécula de unión al antígeno para eliminar antígeno del plasma se puede evaluar, por ejemplo, mediante la administración de un antígeno soluble y una molécula de unión al antígeno in vivo, y la medición de la concentración del antígeno soluble en plasma después de la administración. Cuando la concentración de antígeno soluble en plasma después de la administración del antígeno soluble y molécula de unión al antígeno se reduce mediante el aumento de la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro, o mediante el aumento de su actividad de unión a FcRn humano y la reducción simultánea de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro, se puede juzgar que la capacidad de la molécula de unión al antígeno para eliminar antígeno plasmático está aumentada. Una forma de antígeno soluble puede ser el antígeno unido a la molécula de unión al antígeno o antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno cuya concentración se puede determinar como "concentración del antígeno unido a la molécula de unión al antígeno en plasma" y "concentración del antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno en plasma" respectivamente (Esta última es sinónimo de "concentración de antígeno libre en plasma". Debido a que la "concentración de antígeno total en plasma" significa la suma de la concentración del antígeno unido y antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno, o "concentración de antígeno libre en plasma" que es la concentración del antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno, la concentración de antígeno soluble se puede determinar como "concentración de antígeno total en plasma". Varios procedimientos para medir la "concentración de antígeno total en plasma" o "concentración de antígeno libre en plasma" son bien conocidos en la técnica como se describe de aquí en adelante en la presente memoria.

La presente descripción también proporciona procedimientos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno. Más específicamente, la presente descripción proporciona procedimientos para mejorar la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido mediante el aumento de la actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. Además, la presente descripción proporciona procedimientos para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno.

La presente descripción también proporciona procedimientos para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido mediante el uso de un

dominio de unión a FcRn humano que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original del dominio de unión a FcRn humano que comprende el dominio Fc de IgG por un aminoácido diferente.

Además, la presente descripción proporciona procedimientos para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno, mediante la reducción de la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente con una farmacocinética mejorada a menos de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido, mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente con una farmacocinética mejorada. La presente descripción también proporciona procedimientos para mejorar la farmacocinética mediante la sustitución por histidina de al menos un aminoácido o la inserción de al menos una histidina en el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno descrita anteriormente con una farmacocinética mejorada.

En la presente memoria, "aumento de la farmacocinética", "mejora de la farmacocinética", y "farmacocinética superior" se puede expresar de nuevo como "aumento de la retención plasmática (sangre)", "mejora de la retención plasmática (sangre)", " retención plasmática superior (sangre)", y "retención plasmática prolongada (sangre)". Estos términos son sinónimos.

En la presente memoria, "mejora de la farmacocinética" significa no solo la prolongación del período hasta la eliminación del plasma (por ejemplo, hasta que la molécula de unión al antígeno se degrada en forma intracelular o similares y no puede retornar al plasma) después de la administración de la molécula de unión al antígeno a los seres humanos o animales no humanos tales como ratones, ratas, monos, conejos, y perros, sino también prolongación de la retención plasmática de la molécula de unión al antígeno en una forma que permite la unión al antígeno (por ejemplo, en una forma libre de antígeno de la molécula de unión al antígeno) durante el período de administración hasta la eliminación debido a la degradación. La IgG humana intacta se puede unir a FcRn de animales no humanos. Por ejemplo, con preferencia se puede usar el ratón para realizar la administración a fin de confirmar la propiedad de la molécula de unión al antígeno de la invención debido a que la IgG humana intacta se puede unir a FcRn de ratón más fuerte que el FcRn humano (Int Immunol. Diciembre de 2001; 13(12): 1551-9). A modo de otro ejemplo, el ratón en el que se alteran sus genes de FcRn nativos y un transgén para el gen FcRn humano se aloja para expresar (Methods Mol Biol. 2010; 602: 93-104) también se pueden usar con preferencia para realizar la administración con el fin de confirmar la propiedad de la molécula de unión al antígeno de la invención descrita de aquí en adelante. Específicamente, la "mejora de la farmacocinética" también incluye la prolongación del período hasta la eliminación debido a la degradación de molécula de unión al antígeno no unida a antígenos (la forma libre de antígeno de la molécula de unión al antígeno). La molécula de unión al antígeno en el plasma no se puede unir a un nuevo antígeno si la molécula de unión al antígeno ya se ha unido a un antígeno. Por lo tanto, cuanto más largo es el período en el que la molécula de unión al antígeno no está unida a un antígeno, más largo es el período que puede unirse a un antígeno nuevo (más alta es la probabilidad de unión a otro antígeno). Esto permite la reducción del período de tiempo en que un antígeno está libre de la molécula de unión al antígeno in vivo y la prolongación del período en que un antígeno está unido a la molécula de unión al antígeno. Se puede aumentar la concentración en plasma de la forma libre de antígeno de la molécula de unión al antígeno y el período en que el antígeno está unido a la molécula de unión al antígeno se puede prolongar mediante la aceleración de la eliminación del antígeno del plasma mediante la administración de la molécula de unión al antígeno. Específicamente, en la presente memoria la "mejora de la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno" incluye la mejora de un parámetro farmacocinético de la forma libre de antígeno de la molécula de unión al antígeno (cualquiera de la prolongación de la vida media en el plasma, prolongación de tiempo de retención medio en plasma, y el deterioro de la eliminación plasmática), prolongación del período que el antígeno se une a la molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno, y aceleración de la eliminación de antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno del plasma. La mejora de la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno se puede evaluar mediante la determinación de cualquiera de los parámetros, vida media en plasma, tiempo de retención plasmática medio, y eliminación plasmática para la molécula de unión al antígeno o la forma libre de antígeno de esta ("Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice)" Nanzando). Por ejemplo, la concentración plasmática de la molécula de unión al antígeno o forma libre de antígeno de este se determina después de la administración de la molécula de unión al antígeno a ratones, ratas, monos, conejos, perros o seres humanos. Luego, se determina cada parámetro. Cuando se prolonga la vida media plasmática o el tiempo medio de retención plasmática, se puede juzgar que la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno se mejora. Los parámetros se pueden determinar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los parámetros se pueden evaluar apropiadamente, por ejemplo, mediante un análisis no compartimental usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. La concentración plasmática de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno se puede determinar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando el procedimiento de ensayo descrito en Clin Pharmacol. Abril de 2008; 48 (4): 406 - 17.

En la presente memoria, "mejora de la farmacocinética" también incluye la prolongación del período en que un

antígeno está unido a una molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno. Se puede evaluar si se prolonga el período en que un antígeno se une a la molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno mediante la determinación de la concentración plasmática libre de antígeno. La prolongación se puede juzgar sobre la base de determinada concentración plasmática libre de antígeno o el período de tiempo requerido para un aumento en la relación de concentración de antígeno libre a la concentración de antígeno total.

La concentración plasmática de antígeno libre no unido a la molécula de unión al antígeno o la relación de concentración de antígeno libre a la concentración total se puede determinar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por el procedimiento descrito en Pharm Res. Enero de 2006; 23 (1): 95-103. Alternativamente, cuando un antígeno exhibe una función particular in vivo, se puede evaluar si el antígeno está unido a una molécula de unión al antígeno que neutraliza la función del antígeno (molécula antagonista), mediante el análisis de si se neutraliza la función del antígeno. Se puede evaluar si la función del antígeno está neutralizada mediante el ensayo de un marcador in vivo que refleje la función del antígeno. Se puede evaluar si el antígeno está unido a una molécula de unión al antígeno que activa la función del antígeno (molécula agonística) mediante el ensayo de un marcador in vivo que refleja la función del antígeno.

La determinación de la concentración plasmática libre de antígeno y la relación de la cantidad de antígeno libre en plasma a la cantidad de antígeno total en plasma, ensayo de marcador in vivo, y tales mediciones no están particularmente limitadas; sin embargo, con preferencia los ensayos se llevan a cabo después de que ha pasado un cierto período de tiempo después de la administración de la molécula de unión al antígeno. En la presente descripción, el período después de la administración de la molécula de unión al antígeno no está particularmente limitado; los expertos en la técnica pueden determinar el período apropiado que depende de las propiedades y similares de la molécula de unión al antígeno administrada. Tales períodos incluyen, por ejemplo, un día después de la administración de la molécula de unión al antígeno, tres días después de la administración de la molécula de unión al antígeno, siete días después de la administración de la molécula de unión al antígeno, 14 días después de la administración de la molécula de unión al antígeno, y 28 días después de la administración de la molécula de unión al antígeno. En la presente memoria, la "concentración de antígeno en plasma" significa la "concentración de antígeno total en plasma" que es la suma de la concentración del antígeno unido y antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno o "concentración de antígeno libre en plasma" que es la concentración del antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno.

La concentración de antígeno total en plasma se puede reducir mediante la administración de la molécula de unión al antígeno de la presente invención en 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1,000 veces, o incluso mayor en comparación con la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia que comprende el dominio Fc de IgG humana intacta como un dominio de unión a FcRn humano o en comparación con cuando no se administra la molécula del dominio de unión al antígeno de la presente invención.

La relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede calcular como se muestra a continuación;

valor A: Concentración molar de antígeno en cada punto de tiempo

valor B: Concentración molar de la molécula de unión al antígeno en cada punto de tiempo

valor C: Concentración molar de antígeno por concentración molar de la molécula de unión al antígeno (relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno) en cada punto de tiempo C=A/B.

El valor C menor indica mayor eficiencia de la eliminación de antígeno por molécula de unión al antígeno mientras que el valor C más alto indica menor eficiencia de la eliminación de antígeno por molécula de unión al antígeno.

La relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede calcular como se describió anteriormente.

La relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede reducir mediante la administración de la molécula de unión al antígeno de la presente invención en 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1.000 veces, o incluso mayor en comparación con la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia que comprende el dominio Fc de IgG humana intacta como un dominio de unión a FcRn humano.

En la presente memoria, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana intacta con preferencia se usa como la IgG humana intacta con un fin de una IgG humana intacta de referencia para comparar con las moléculas de unión al antígeno por su actividad de unión a FcRn o actividad in vivo. Con preferencia, se puede usar apropiadamente una molécula de unión al antígeno de referencia que comprende el mismo dominio de unión al antígeno como una molécula de unión al antígeno del dominio Fc de IgG humana de interés e intacta como un dominio de unión a FcRn humano. Con más preferencia, una IgG1 humana intacta se usa para un fin de una IgG humana intacta de referencia para comparar con las moléculas de unión al antígeno por su actividad de unión a FcRn humano o actividad in vivo.

La reducción de la concentración de antígeno total en plasma o relación molar de antígeno/anticuerpo se puede evaluar como se describe en los Ejemplo 6, 8, y 13. Más específicamente, usando la línea 32 o línea 276 de ratón

transgénico que expresa FcRn humano (Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. 2010; 602:93-104), estas se pueden evaluar mediante un modelo de co-inyección de antígeno-anticuerpo o un modelo de infusión de antígeno en estado estacionario cuando la molécula de unión al antígeno no reacciona de forma cruzada con el antígeno equivalente de ratón. Cuando una molécula de unión al antígeno reacciona de forma cruzada con el equivalente de ratón, se puede evaluar simplemente inyectando una molécula de unión al antígeno a la línea 32 o línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano (Jackson Laboratories). En el modelo de co-inyección, se administra una mezcla de molécula de unión al antígeno y antígeno al ratón. En el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario, la bomba de infusión que contiene la solución de antígeno se implanta en el ratón para conseguir una concentración de antígeno en plasma constante, y luego se inyecta una molécula de unión al antígeno al ratón. La molécula de unión al antígeno de prueba se administra a la misma dosis. La concentración de antígeno total en plasma, concentración de antígeno libre en el plasma y la concentración de molécula de unión al antígeno de plasma se mide en el punto de tiempo apropiado usando un procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

La concentración de antígeno total o libre en plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede medir 2, 4, 7, 14, 28, 56, o 84 días después de la administración para evaluar el efecto a largo plazo de la presente invención. En otras palabras, una concentración de antígeno en plasma de largo plazo se determina mediante la medición de la concentración de antígeno total o libre en plasma y la relación molar antígeno/ molécula de unión al antígeno 2, 4, 7, 14, 28, 56, o 84 días después de la administración de una molécula de unión al antígeno a fin de evaluar la propiedad de la molécula de unión al antígeno descrita en la presente memoria.

Si se obtiene la reducción de la concentración de antígeno en plasma o relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno mediante la molécula de unión al antígeno descrita en la presente se puede determinar por la evaluación de la reducción de uno o más de los puntos de tiempo descritos anteriormente.

La concentración de antígeno total o libre en plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede medir 15 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, o 24 horas después de la administración para evaluar el efecto a largo plazo de la presente invención. En otras palabras, una concentración de antígeno en plasma a largo plazo se determina mediante la medición de la concentración de antígeno total o libre en plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno 15 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, o 24 horas después de la administración de una molécula de unión al antígeno con el fin de evaluar la propiedad de la molécula de unión al antígeno descrita en la presente memoria.

La vía de administración de una molécula de unión al antígeno de la presente invención se puede seleccionar de la inyección intradérmica, intravenosa, intravítrea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral e intramuscular.

En la presente descripción, se prefiere la mejora de la farmacocinética en los seres humanos. Cuando la retención plasmática de plasma en humanos es difícil de determinar, se puede predecir sobre la base de la retención plasmática en ratones (por ejemplo, ratones normales, ratones transgénicos que expresan antígeno humano, ratones transgénicos que expresan FcRn humano) o monos (por ejemplo, monos cynomolgus).

En la presente memoria, el intervalo de pH ácido normalmente se refiere a pH 4,0 a pH 6,5. El intervalo de pH ácido con preferencia es un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 5,5 a pH 6,5, con preferencia seleccionado de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, y 6,5, con particular preferencia pH 5,8 a pH 6,0, que está cercano al pH en endosoma temprano in vivo. Entretanto, en la presente el intervalo de pH neutro normalmente se refiere a pH 6,7 a pH 10,0. El intervalo de pH neutro con preferencia es un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 7,0 a pH 8,0, con preferencia seleccionado de pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, y 8,0, con particular preferencia pH 7,4, que es cercano al pH del plasma in vivo (sangre). El pH 7,0 se puede usar como una alternativa al pH 7,4 cuando es difícil evaluar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano debido a su baja afinidad a pH 7,4. Como una temperatura empleada en la condición de ensayo, una afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano se puede evaluar a cualquier temperatura de 10 grados C a 50 grados C. Con preferencia, se emplea una temperatura de 15 grados C a 40 grados C a fin de determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Con más preferencia, también se emplea cualquier temperatura de 20 grados C a 35 grados C, como cualquiera de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, y 35 grados C a fin de determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Una temperatura a 25 grados C descrita en el Ejemplo 5 es una del ejemplo para la realización descrita en la presente memoria.

En consecuencia, en la presente "reducción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro" significa que la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 está alterada en comparación con su actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0. Con preferencia, la frase anterior significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,5 a pH 6,5 está alterada en comparación con la de un pH 7,0 a pH 8,0, con más preferencia significa que su actividad de unión al antígeno en el pH endosómico temprano está alterada en comparación con su actividad de unión al antígeno en el plasma pH in vivo. En forma específica, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,8 a pH 6,0 está alterada en comparación con la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 7,4.

Entretanto, en la presente la expresión "reducción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro" también se expresa como "aumento de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro a más que en el intervalo de pH ácido". En forma específica, en la presente invención, es posible aumentar la relación de actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno entre los intervalos de pH ácido y neutro. Por ejemplo, el valor de KD (pH 5,8)/KD (pH 7,4) aumenta en una realización descrita a continuación. La relación de actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno entre los intervalos de pH ácido y neutro se puede aumentar, por ejemplo, mediante la reducción de su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido, lo que aumenta su actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro, o ambos.

En la presente memoria, la expresión "alteración de la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido en comparación con la del intervalo de pH neutro" algunas veces se usa en vez de "reducción de la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro".

En la presente memoria, la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido significa la actividad de unión a FcRn humano a pH 4,0 a pH 6,5, con preferencia la actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5 a pH 6,5, y con particular preferencia la actividad de unión a FcRn humano a pH 5,8 a pH 6,0, que es comparable con el pH endosómico temprano in vivo. Entretanto, en la presente la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro significa la actividad de unión a FcRn humano a pH 6,7 a pH 10,0, con preferencia la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 a pH 8,0, y con particular preferencia la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,4, que es comparable a la del pH plasmático in vivo.

Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente tienen un dominio de unión a FcRn humano. El dominio de unión a FcRn humano no está particularmente limitado, siempre que las moléculas de unión al antígeno exhiban la actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro. Alternativamente, el dominio puede tener una actividad de unión a FcRn humano directa o indirecta. Tales dominios incluyen, por ejemplo, el dominio Fc de la inmunoglobulina de tipo IgG, albúmina, dominio de albúmina 3, anticuerpos FcRn antihumano, péptidos FcRn antihumanos y las moléculas del armazón de anti-FcRn humano, todas las cuales tienen la actividad de unirse directamente a FcRn humano; y las moléculas que se unen a IgG o albúmina, que tienen la actividad para unirse indirectamente a FcRn humano. Tales dominios preferidos tienen actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro. Es posible usar los dominios sin ninguna alteración siempre que ya tengan actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro. Cuando los dominios solo tienen actividad de unión a FcRn humano débil o nula en los intervalos de pH ácido y/o neutro, la actividad de unión a FcRn humano se puede conferir mediante la alteración de aminoácidos en las moléculas de unión al antígeno. Sin embargo, se prefiere que la actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y/o neutro sea conferida mediante la alteración de aminoácidos en el dominio de unión a FcRn humano. De forma alternativa, los aminoácidos de los dominios que ya tienen actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y/o neutro se pueden alterar para aumentar la actividad de unión a FcRn humano. Las alteraciones de aminoácido deseadas en el dominio de unión a FcRn humano se pueden seleccionar mediante la comparación de la actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y/o neutro antes y después de la alteración de aminoácido.

El dominio de unión a FcRn humano preferido es una región que se une directamente a FcRn humano. Tales regiones de unión a FcRn humanas preferidas incluyen, por ejemplo, dominios Fc de anticuerpo. Mientras tanto, las regiones capaces de unirse a un polipéptido tal como albúmina o IgG, que tiene actividad de unión a FcRn humano, se pueden unir indirectamente al FcRn humano a través de albúmina, IgG o tal. Por lo tanto, una región de unión a FcRn humano de la presente invención es una región que se une a un polipéptido que tiene actividad de unión a FcRn humano.

Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente no están particularmente limitadas, siempre que incluyan un dominio de unión al antígeno que tiene una actividad de unión específica para un antígeno blanco. Tales dominios preferidos de unión al antígeno comprenden, por ejemplo, dominios que tienen una región de unión al antígeno de un anticuerpo. La región de unión al antígeno de un anticuerpo comprende, por ejemplo, CDR y regiones variables. Cuando la región de unión a antígeno de un anticuerpo es CDR, puede contener las seis CDR del anticuerpo completo, o uno, dos o más CDR. Cuando las CDR están contenidas como una región de unión del anticuerpo, pueden comprender supresiones, sustituciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o pueden ser una porción de CDR.

Por otra parte, las moléculas de unión al antígeno para usar en los procedimiento de la presente descripción comprende moléculas de unión al antígeno que tienen una actividad antagonista (moléculas de unión al antígeno antagonistas), moléculas de unión al antígeno que tienen una actividad agonista (molécula de unión al antígeno agonista), y moléculas que tienen citotoxicidad. En una realización preferida, las moléculas de unión al antígeno comprenden moléculas de unión al antígeno antagonistas, en particular, moléculas de unión al antígeno antagonistas que reconocen un antígeno tal como un receptor o citoquina.

La molécula de unión al antígeno de interés no está particularmente limitada, y puede ser cualquier molécula de unión al antígeno. La molécula de unión al antígeno de la presente descripción con preferencia incluye actividad de unión al antígeno (dominio de unión al antígeno) y dominio de unión a FcRn humano. En particular, la molécula de

unión al antígeno preferida incluye un dominio que se une al FcRn humano. La molécula de unión al antígeno que incluye tanto el dominio de unión al antígeno como el dominio de unión al FcRn humano incluye, por ejemplo, anticuerpos. Los anticuerpos preferidos en el contexto de la presente descripción incluyen, por ejemplo, anticuerpos IgG. Cuando el anticuerpo para usar es un anticuerpo IgG, el tipo de IgG no está limitado; se pueden usar IgG pertenecientes a cualquier isotipo (subclase) tales como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Además, las moléculas de unión a antígeno de la presente descripción pueden incluir la región constante del anticuerpo, y se pueden introducir mutaciones de aminoácidos en la región constante. Las mutaciones de aminoácidos que se han de introducir incluyen, por ejemplo, las que potencian o alteran la unión al receptor Fcgamma (Proc Natl Acad Sci USA, 14 de marzo de 2006; 103 (11): 4005-10), pero no se limitan a estos ejemplos. Alternativamente, también es posible alterar la unión dependiente del pH mediante la selección de una región constante apropiada tal como la de IgG2.

Cuando la molécula de unión al antígeno de interés es un anticuerpo, puede ser un anticuerpo derivado de cualquier animal, tal como un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, anticuerpo de rata, anticuerpo de conejo, anticuerpo de cabra o anticuerpo de camello. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo alterado, por ejemplo, un anticuerpo quimérico y, en particular, un anticuerpo alterado que incluye Las sustituciones de aminoácidos en la secuencia de un anticuerpo humanizado, etc. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos biespecíficos, productos de modificación de anticuerpos ligados con diversas moléculas y polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpos.

Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados mediante la combinación de secuencias derivadas de diferentes animales. Específicamente, el anticuerpo quimérico incluye, por ejemplo, anticuerpos que tienen regiones variables (V) de cadena pesada y liviana a partir de un anticuerpo de ratón y regiones constantes de cadena pesada y liviana (C) de un anticuerpo humano.

Los “anticuerpos humanizados”, también denominados anticuerpos humanos reformados, son anticuerpos en los que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón, se trasplantan a las CDR de un anticuerpo humano. Se conocen procedimientos para identificar CDR (Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877). También se conocen tecnologías de recombinación genética general adecuadas para este propósito (ver la solicitud de patente europea EP 125023 y WO 96/02576).

El anticuerpo biespecífico se refiere a un anticuerpo que tiene, en la misma molécula de anticuerpo, regiones variables que reconocen epítopos diferentes. Un anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo que reconoce dos o más antígenos diferentes, o un anticuerpo que reconoce dos o más epítopos diferentes sobre un mismo antígeno.

Además, los polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$, scFvs (Nat Biotechnol., Septiembre de 2005, 23 (9): 1126-36), anticuerpos del dominio (dAbs) (WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv - Fc (WO 2005/037989), dAb - Fc, y proteínas de fusión Fc. Se puede usar el dominio Fc como un dominio de unión a FcRn humano cuando una molécula incluye un dominio Fc. De forma alternativa, un dominio de unión a FcRn se puede fusionar a estas moléculas.

Además, las moléculas de unión al antígeno que son aplicables a la presente descripción pueden ser moléculas tipo anticuerpo. Una molécula tipo anticuerpo (molécula de armazón, molécula de péptido) es una molécula que puede exhibir funciones mediante la unión a una molécula blanco (Current Opinion in Biotechnology (2006) 17: 653-658; Current Opinion in Biotechnology (2007) 18: 1-10; Current Opinion in Structural Biology (1997) 7: 463-469; Protein Science (2006) 15: 14-27), e incluye, por ejemplo, DARPins (WO 2002/020565), Affibody (WO 1995/001937), Avimer (WO 2004/044011; WO 2005/040229), y Adnectina (WO 2002/032925). Si estas moléculas tipo anticuerpo se pueden unir a moléculas blanco de una manera dependiente del pH y/o tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, es posible facilitar la captación de antígeno en las células por las moléculas de unión al antígeno, facilitar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno, y mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única.

Además, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína resultante de la fusión entre un dominio de unión a FcRn humano y una proteína receptora que se une a un blanco que incluye un ligando e incluye, por ejemplo, proteínas de fusión TNFR-Fc, proteínas de fusión IL1R-Fc, proteínas de fusión VEGFR-Fc y proteínas de fusión CTLA4-Fc (Nat Med. Enero de 2003; 9(1): 47-52; BioDrugs. (2006) 20(3): 151-60). Si estas proteínas de fusión de dominio de unión a FcRn humano-receptor se unen a una molécula blanco que incluye un ligando de una manera dependiente del pH y/o tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, es posible facilitar la captación de antígeno en las células por moléculas de unión al antígeno, facilitan la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de moléculas de unión al antígeno y mejoran la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno y aumentan el número de antígenos a los que puede unir una molécula de unión al antígeno única. Una proteína receptora está adecuadamente diseñada y modificada para incluir un dominio de unión de la proteína receptora a un blanco que incluye un ligando. Como se hace referencia al ejemplo anterior, que incluye proteínas de fusión TNFR-Fc, proteínas de fusión IL1R-Fc, proteínas de fusión VEGFR-Fc y proteínas de fusión CTLA4-Fc, con preferencia se una molécula receptora soluble que comprende un dominio extracelular de aquellas proteínas receptoras que son necesarias para unirse a los blancos que incluyen ligandos en la presente

invención. La molécula receptora diseñada y modificada se denomina como un receptor artificial en la presente descripción. Un procedimiento empleado para diseñar y modificar una molécula receptora para construir una molécula receptora artificial es conocido en la técnica.

Además, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína de fusión en la que la proteína del ligando artificial que se une a un blanco y tiene un efecto neutralizante se fusiona con un dominio de unión a FcRn humano, y una proteína del ligando artificial incluye, por ejemplo, IL-6 mutante (EMBO J. 15 de diciembre de 1994; 13(24): 5863-70). Si tales proteínas de fusión del ligando artificiales se pueden unir a moléculas blanco de una manera dependiente del pH y/o tienen actividad de unión al FcRn humano en el intervalo de pH neutro, es posible facilitar la captación de antígeno en las células por las moléculas de unión al antígeno, facilitar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno, y mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única.

Además, los anticuerpos descritos en la presente pueden incluir cadenas de azúcar modificadas. Los anticuerpos con cadenas de azúcar modificadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos con glicosilación modificada (WO 99/54342), anticuerpos que son deficientes en fucosa que se añade a la cadena de azúcar (WO 00/61739, WO 02/31140, WO 2006/067847; WO2 006/067913), y anticuerpos que tienen cadenas de azúcar con GlcNAc de bisección (WO 02/79255).

Las condiciones usadas en el ensayo para la actividad de unión al antígeno o unión a FcRn humano diferente de pH pueden ser seleccionadas apropiadamente por los expertos en la técnica y las condiciones no están particularmente limitadas. Por ejemplo, las condiciones de uso del tampón MES a 37 grados C como se describe en WO 2009/125825 se puede usar para determinar la actividad. En otra realización, el tampón Na-fosfato a 25 grados C como se describe en los Ejemplos 4 o 5 se puede usar para determinar la actividad. Entretanto, la actividad de unión al antígeno y actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno se puede determinar por los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare) o tales. Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de una molécula de unión al antígeno para unirse al antígeno soluble se puede determinar mediante la carga del antígeno como un analito en un chip inmovilizado con la molécula de unión al antígeno. De forma alternativa, cuando el antígeno es un antígeno tipo membrana, la actividad de la molécula de unión al antígeno para unirse al antígeno tipo membrana se puede determinar mediante la carga de la molécula de unión al antígeno como un analito en un chip con antígeno inmovilizado. La actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante la carga de FcRn humano o la molécula de unión al antígeno como un analito en un chip inmovilizado con la molécula de unión al antígeno o FcRn humano, respectivamente.

La relación entre la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido y en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitada siempre que la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido es menor que en el intervalo de pH neutro. Sin embargo, el valor de KD (pH 5,8)/KD (pH 7,4), que es una relación de constante de disociación (KD) contra un antígeno a pH 5,8 y pH 7,4, con preferencia es 2 o mayor, con más preferencia 10 o mayor, y aún con más preferencia 40 o mayor. El límite superior de la KD (pH 5,8)/KD (pH 7,4) valor no está particularmente limitada, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 400, 1.000, o 10.000, siempre que la producción sea posible usando las tecnologías de los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, el valor de actividad de unión al antígeno se puede presentar en términos de la constante de disociación (KD). A la inversa, cuando el antígeno es un antígeno tipo membrana, la actividad se puede presentar en términos de constante de disociación aparente (KD aparente). La constante de disociación (KD) y constante de disociación aparente (KD aparente) se puede determinar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare), diagrama de Scatchard, citómetro de flujo, o tal.

Otros parámetros que son representativos de la relación de actividad de unión al antígeno entre los intervalos de pH ácido y neutro incluyen, por ejemplo, constante de la velocidad de disociación k_d. Cuando la constante de la velocidad de disociación (k_d) se usa en vez de la constante de disociación (KD) como un parámetro representativo de la relación de actividad de unión, el valor de k_d (en el intervalo de pH ácido)/k_d (en el intervalo de pH neutro), que es una relación de k_d (constante de la velocidad de disociación) contra un antígeno en el intervalo de pH ácido y intervalo de pH neutro, con preferencia es 2 o mayor, con más preferencia 5 o mayor, incluso con más preferencia 10 o mayor, y aún con más preferencia 30 o mayor. El límite superior de la k_d (en el intervalo de pH ácido)/k_d (en el intervalo de pH neutro) valor no está particularmente limitada, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 50, 100, o 200, siempre que la producción sea posible usando las tecnologías de los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, el valor de actividad de unión al antígeno se puede presentar usando la constante de la velocidad de disociación (k_d). De forma alternativa, cuando el antígeno es un antígeno tipo membrana, el valor se puede presentar en términos de k_d aparente (constante de la velocidad de disociación aparente). La constante de la velocidad de disociación (k_d) y la constante de la velocidad de disociación aparente (k_d aparente) se pueden determinar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare), citómetro de flujo, o similares.

Cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se determina a diferentes pH, se prefiere que las condiciones de medición excepto el pH sean constantes.

Los procedimientos para la reducción (alteración) de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro (procedimientos para conferir la capacidad de unión dependiente de pH) no están particularmente limitados y se puede lograr mediante cualquiera de los procedimientos. En forma específica, como se describe en el documento WO 2009/125825, los procedimientos incluyen, por ejemplo, procedimientos para la reducción (alteración) de la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro mediante la sustitución por histidina de un aminoácido de la molécula de unión al antígeno o la inserción de histidina en la molécula de unión al antígeno. Ya se conoce que se puede conferir a un anticuerpo una actividad de unión al antígeno dependiente de pH mediante la sustitución por histidina de un aminoácido del anticuerpo (FEBS Letter (1992) 309(1): 85-88). Tales sitios de mutación (sustitución) por o inserción de histidina no están particularmente limitados; y la histidina puede sustituir a un aminoácido en cualquier sitio o insertarse en cualquier sitio. Los sitios preferidos para la mutación (sustitución) por o inserción de histidina incluyen, por ejemplo, regiones donde la mutación o inserción tiene un impacto sobre la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno. Tales regiones incluyen sitios donde la mutación o inserción reduce (altera) la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro (el valor de KD (en el intervalo de pH ácido)/KD (en el intervalo de pH neutro) está aumentado) en comparación con antes de la mutación o inserción. Cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, tales regiones incluyen, por ejemplo, regiones variables y CDR del anticuerpo. El número de mutaciones o inserciones de histidina para introducir (obtener) puede ser determinado apropiadamente por los expertos en la técnica. La sustitución por histidina se puede introducir en solo un sitio único, o en dos o más sitios. De forma alternativa, la histidina se puede insertar en solo un sitio único, o en dos o más sitios. Además, las mutaciones diferentes de la mutación por histidina (mutación (supresión, adición, inserción, y/o sustitución) por un aminoácido diferente de histidina) se puede introducir además de la mutación por histidina. De forma alternativa, la mutación de histidina se puede combinar con inserción de histidina. Tal sustitución por o inserción de histidina se puede llevar a cabo por un procedimiento aleatorio tal como barrido de histidina, que se realiza mediante el uso de histidina en vez de barrido de alanina conocido para los expertos en la técnica. Luego, las moléculas de unión al antígeno que tienen un valor de KD que mayor (en el intervalo de pH ácido) /KD (en el intervalo de pH neutro) que antes de la introducción de la mutación se pueden seleccionar de una biblioteca de moléculas de unión al antígeno introducidas con mutación o inserción de histidina aleatoria.

Cuando la histidina se sustituye por un aminoácido en la molécula de unión al antígeno o se inserta histidina en la molécula de unión al antígeno, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro después de la sustitución por o inserción de histidina con preferencia es equivalente a la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro antes de la sustitución por o inserción de histidina, pero no está particularmente limitada a esta. En la presente memoria, "la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro después de la sustitución por o inserción de histidina es equivalente a la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro antes de la sustitución por o inserción de histidina" significa que la molécula de unión al antígeno después de la sustitución por o inserción de histidina retiene 10% o más, con preferencia 50% o más, con más preferencia 80% o más, y aún con más preferencia 90% o más de la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno antes de la sustitución por o inserción de histidina. Cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se reduce debido a la sustitución por o inserción de histidina, la actividad de unión al antígeno se puede ajustar mediante la sustitución, supresión, adición, y/o inserción de uno o más aminoácidos en la molécula de unión al antígeno de modo que la actividad de unión al antígeno es equivalente al de antes de la sustitución por o inserción de histidina. La presente descripción también comprende tales moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión ha sido equivalente como resultado de la sustitución, supresión, adición, y/o inserción de uno o más aminoácidos en la molécula de unión al antígeno después de la sustitución por o inserción de histidina.

Otros procedimientos para la reducción (alteración) de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro incluyen los procedimientos para Las sustituciones de aminoácidos no naturales por aminoácidos en la molécula de unión al antígeno o inserción de aminoácidos no naturales en la molécula de unión al antígeno. Es conocido que el pKa se puede ajustar artificialmente mediante el uso de aminoácidos no naturales (Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34; Chem Soc Rev. 10 de septiembre de 2004, 33 (7). 422-30; Aminoácidos. (1999) 16(3-4): 345-79). En consecuencia, en la presente descripción, es posible usar aminoácidos no naturales en vez de la histidina descrita anteriormente. Los sitios en que se introducen los aminoácidos no naturales no está particularmente limitados, y los aminoácidos no naturales se pueden situar por sustitución o insertar en cualquier sitio. Los sitios preferidos de sustitución o inserción de aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, regiones donde la sustitución o inserción tiene un impacto sobre la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, tales regiones incluyen regiones variables y regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo. Entretanto, el número de aminoácidos no naturales para introducir no está particularmente limitado; y es posible situar por sustitución aminoácidos no naturales en solo un sitio único, o dos o más sitios. De forma alternativa, los aminoácidos no naturales se pueden insertar en solo un sitio único, o dos o más

sitios. Además, otros aminoácidos se pueden suprimir, añadir, insertar, y/o situar por sustitución además de la sustitución por o inserción de aminoácidos no naturales. Además, los aminoácidos no naturales se pueden situar por sustitución y/o insertar en combinación con la sustitución por y/o la inserción de histidina descrita anteriormente. Cualquier aminoácido no natural se puede usar en la presente descripción. Es posible usar aminoácidos no naturales conocidos para los expertos en la técnica.

Cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, los posibles sitios de sustitución por histidina o aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, secuencias CDR y secuencias responsables de la estructura CDR de un anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, los sitios descritos en el documento WO 2009/125825. Las posiciones de aminoácidos se indican de acuerdo con la numeración de Kabat (Kabat EA y otros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

El sistema de numeración de Kabat se utiliza generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena liviana y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU publicado en Kabat et al., Supra). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de los residuos del anticuerpo de IgG1 humana EU. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, las referencias a números de residuo en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración de residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, las referencias a números de residuo en el dominio constante de los anticuerpos significan la numeración de los residuos por el sistema de numeración EU (ver, por ejemplo, el documento WO 2006073941).

Cadena pesada: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b, y H102

Cadena liviana: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92, y L94

De estos sitios de alteración, se asume que H32, H61, L53, L90, y L94 son sitios de alteración muy general.

Cuando el antígeno es un receptor IL-6 (por ejemplo, receptor IL-6 humano), los sitios de alteración preferidos incluyen los siguientes. Sin embargo, los sitios de alteración no están particularmente limitados a estos.

Cadena pesada: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b, y H102

Cadena liviana: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, y L94

En forma específica, las combinaciones preferidas de sitios para sustitución por histidina o aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, la combinación de H27, H31, y H35; la combinación de H27, H31, H32, H35, H58, H62, y H102; la combinación de L32 y L53; y la combinación de L28, L32, y L53. Además, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución en las cadenas pesada y liviana incluyen, por ejemplo, la combinación de H27, H31, L32, y L53.

De estos sitios, la histidina o aminoácidos no naturales se sustituyen solo en un sitio único o más sitios.

Entretanto, cuando la molécula de unión al antígeno es una sustancia que tiene una región constante del anticuerpo, los procedimientos para la reducción (alteración) de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro incluyen, por ejemplo, los procedimientos para alterar los aminoácidos en la región constante del anticuerpo. En forma específica, tales procedimientos comprenden, por ejemplo, los procedimientos para la sustitución de una región constante descrita en el documento WO 2009/125825 (SEC ID NOs: 11, 12, 13, y 14). Entretanto, los procedimientos para altera una región constante del anticuerpo comprenden por ejemplo, procedimientos para evaluar varios isotipos de la región constante (IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4) y seleccionar isotipo que reducen la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido (aumento de la velocidad de disociación en el intervalo de pH ácido). Tales procedimientos también incluyen procedimientos para reducir la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido (aumentar la velocidad de disociación en el intervalo de pH ácido) mediante la introducción de Las sustituciones de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de los isotipos de tipo salvaje (secuencias de aminoácidos de tipo salvaje IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4). La secuencia de la región bisagra en la región constante del anticuerpo es considerablemente diferente entre los isotipos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y la diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región bisagra tiene un gran impacto en la actividad de unión al antígeno. De este modo, es posible seleccionar un isotipo apropiado para reducir la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido (aumentar la velocidad de disociación en el intervalo de pH ácido) de acuerdo con el tipo de antígeno o epítopo. Además, debido a que la diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región bisagra tiene un gran impacto en la actividad de unión al antígeno, se supone que los sitios de sustitución de aminoácidos preferidos en las secuencias de aminoácidos de isotipos de tipo salvaje están dentro de la región bisagra.

Cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido está reducida (debilitada) a menos que en el intervalo de pH neutro (cuando el valor de KD (en el intervalo de pH ácido)/KD (en el intervalo de pH neutro) está aumentado) por los procedimientos descritos anteriormente y similares,

generalmente es preferible que el valor de KD (en el intervalo de pH ácido)/KD (en el intervalo de pH neutro) es dos veces o más, con preferencia cinco veces o más, y con más preferencia diez veces o más en comparación con el anticuerpo original, pero no está particularmente limitada a estos.

Los procedimientos descritos anteriormente se pueden usar para producir moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido está reducida (debilitada) a menos que en el intervalo de pH neutro (moléculas de unión al antígeno que se unen de manera dependiente del pH) mediante sustitución o inserción de aminoácido de las moléculas de unión al antígeno que no tienen tal propiedad. Otros procedimientos incluyen procedimientos para obtener directamente moléculas de unión al antígeno que tienen la propiedad descrita anteriormente. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen una propiedad de interés deseada se pueden seleccionar directamente mediante el análisis usando la unión de antígeno dependiente del pH como indicador de anticuerpos obtenidos mediante inmunización de animales (ratones, ratas, hámsteres, conejos, ratones transgénicos que expresan inmunoglobulina humana, ratas transgénicas de inmunoglobulina humana, conejos transgénicos de inmunoglobulina humana, llamas, camellos, etc.) con un antígeno. Los anticuerpos se pueden generar mediante tecnología de hibridoma o tecnología de clonación de células B (Proc Natl Acad Sci USA. 23 de julio de 1996; 93(15): 7843-8; J Immunol Methods. 20 de octubre de 2006; 316(1-2): 133-43; Journal of the Association for Laboratory Automation; WO 2004/106377; WO 2008/045140 y WO 2009/113742) que son procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, pero sin limitarse a ellos. Alternativamente, los anticuerpos que tienen la propiedad de interés se pueden seleccionar directamente mediante el análisis que usa la unión del antígeno dependiente del pH como un indicador de una biblioteca que presenta el dominio de unión al antígeno de presentación in vitro. Dicha biblioteca incluye bibliotecas humanas naive, biblioteca inmunizada de animales no humanos y humanos, biblioteca semisintética y biblioteca sintética que son bibliotecas conocidas por los expertos en la técnica (Methods Mol Biol. 2002; 178: 87 - 100; J Immunol Methods, Junio de 2004, 289 (1-2): 65 - 80 y Expert Opin Biol Ther. Mayo de 2007; 7 (5): 763 - 79), pero sin limitarse a ellas.

La presente descripción utilizó una diferencia de pH como una diferencia ambiental entre el plasma y el endosoma para la afinidad de unión diferencial de una molécula de unión al antígeno a un antígeno en el plasma y el endosoma (unión fuerte al plasma y unión débil al endosoma). Debido a que la diferencia ambiental entre el plasma y el endosoma no se limita a una diferencia de pH, la propiedad de unión dependiente del pH sobre la unión de una molécula de unión al antígeno a un antígeno se puede sustituir usando otros factores cuya concentración es diferente dentro del plasma y del endosoma. Este factor también se puede usar para generar un anticuerpo que se une al antígeno dentro del plasma pero se disocia del antígeno dentro del endosoma. Por lo tanto, la presente descripción también incluye una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalo de pH ácido y neutro y una actividad de unión al antígeno más baja en el endosoma que en el plasma, donde la actividad de unión a FcRn humano en el plasma es más fuerte que la de IgG humana intacta.

Los procedimientos para aumentar la actividad de unión a FcRn humano del dominio de unión a FcRn humano en una molécula de unión al antígeno descritos en la presente en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitados y se pueden aumentar con algunos procedimientos. En forma específica, cuando se usa el dominio Fc de una inmunoglobulina tipo IgG como dominio de unión a FcRn humano, la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro se puede aumentar mediante la alteración de sus aminoácidos. Tal dominio Fc de inmunoglobulina tipo IgG preferido para alterar incluye, por ejemplo, el dominio Fc de una IgG humana original (IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 y sus variantes manipuladas genéticamente). Los aminoácidos de cualquier sitio se pueden alterar en otros aminoácidos siempre que la actividad de unión a FcRn humano sea conferida o aumentada en el intervalo de pH neutro. Cuando la molécula de unión al antígeno tiene un dominio Fc de IgG1 humana como el dominio de unión a FcRn humano, se prefiere que la molécula tenga alteraciones que potencien la unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro en comparación con la de la IgG1 humana original. Los aminoácidos donde se puede obtener tal alteración incluyen, por ejemplo, aminoácidos de las posiciones 221 a 225, 227, 228, 230, 232, 233 a 241, 243 a 252, 254 a 260, 262 a 272, 274, 276, 278 a 289, 291 a 312, 315 a 320, 324, 325, 327 a 339, 341, 343, 345, 360, 362, 370, 375 a 378, 380, 382, 385 a 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 a 438, 440, y 442 (numeración EU). Más específicamente, tales alteraciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, las listadas en la Tabla 1. La unión a FcRn del dominio Fc de una inmunoglobulina tipo IgG en el intervalo de pH neutro se pueden potenciar mediante el uso de las alteraciones descritas anteriormente.

Además, las alteraciones que pueden potenciar la unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido en comparación con la IgG humana original se muestran como un ejemplo en la Tabla 2. Cuando las alteraciones apropiadas que también pueden potenciar la unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro se seleccionan de las alteraciones descritas anteriormente, son aplicables a la presente descripción. Mientras tanto, las combinaciones de alteraciones que pueden potenciar la unión de Fv4-IgG1 a FcRn humano en condiciones ácidas se muestran en las Tablas 6-1 y 6-2. Los aminoácidos particularmente preferidos para alterar en el dominio Fc de IgG humana original incluyen, por ejemplo, aminoácidos de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU). La actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno se puede aumentar en el intervalo de pH neutro mediante la sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos descritos anteriormente por un aminoácido diferente.

Las alteraciones particularmente preferidas, incluyen por ejemplo,

una sustitución de aminoácido Gly por Met en la posición 237;

una sustitución de aminoácido Pro por Ala en la posición 238;

una sustitución de aminoácido Ser por Lys en la posición 239;

una sustitución de aminoácido Lys por Ile en la posición 248;

una sustitución de aminoácido Thr por Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 250;

una sustitución de aminoácido Met por Phe, Trp, o Tyr en la posición 252;

una sustitución de aminoácido Ser por Thr en la posición 254;

una sustitución de aminoácido Arg por Glu en la posición 255;

una sustitución de aminoácido Thr por Asp, Glu, o Gln en la posición 256;

una sustitución de aminoácido Pro por Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, o Val en la posición 257;

una sustitución de aminoácido Glu por His en la posición 258;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala en la posición 265;

una sustitución de aminoácido Asp por Phe en la posición 270;

una sustitución de aminoácido Asn por de Ala, o Glu en la posición 286;

una sustitución de aminoácido Thr por His en la posición 289;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala en la posición 297;

una sustitución de aminoácido Ser por Gly en la posición 298;

una sustitución de aminoácido Val por Ala en la posición 303;

una sustitución de aminoácido Val por Ala en la posición 305;

una sustitución de aminoácido Thr por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 307;

una sustitución de aminoácido Val por Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, o Thr en la posición 308;

una sustitución de aminoácido Leu o Val por Ala, Asp, Glu, Pro, o Arg en la posición 309;

una sustitución de aminoácido Gln por Ala, His, o Ile en la posición 311;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala, o His en la posición 312;

una sustitución de aminoácido Leu por Lys o Arg en la posición 314;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala, o His en la posición 315;

una sustitución de aminoácido Lys por Ala en la posición 317;

una sustitución de aminoácido Asn por Gly en la posición 325;

una sustitución de aminoácido Ile por Val en la posición 332;

una sustitución de aminoácido Lys por Leu en la posición 334;

una sustitución de aminoácido Lys por His en la posición 360;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala en la posición 376;

una sustitución de aminoácido Glu por Ala en la posición 380;

una sustitución de aminoácido Glu por Ala en la posición 382;

una sustitución de aminoácido Asn o Ser por Ala en la posición 384;

una sustitución de aminoácido Gly por Asp o His en la posición 385;

una sustitución de aminoácido Gln por Pro en la posición 386;

una sustitución de aminoácido Pro por Glu en la posición 387;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala o Ser en la posición 389;

una sustitución de aminoácido Ser por Ala en la posición 424;

una sustitución de aminoácido Met por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, o Tyr en la posición 428;

una sustitución de aminoácido His por Lys en la posición 433;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala, Phe, His, Ser, Trp, o Tyr en la posición 434;

y una sustitución de aminoácido Tyr por His o Phe en la posición 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original. Entretanto, el número de aminoácidos para alterar no está particularmente limitada; y es posible alterar los aminoácidos solo en un sitio único o en dos o más sitios. Las combinaciones de dos o más alteraciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, las mostradas en la Tabla 3. Entretanto, las combinaciones de alteraciones que pueden potenciar la unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido en comparación con la IgG humana original se muestran en las Tablas 4-1 a 4-5. Cuando las combinaciones apropiadas de alteraciones que también pueden potenciar la unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro se seleccionan de las alteraciones descritas anteriormente, son aplicables a la presente descripción. Además, las combinaciones de alteraciones que pueden potenciar la unión de Fv4-IgG1 a FcRn humano en condiciones neutras se muestran en Tablas 6-1 y 6-2.

El símbolo "^" en las Tablas muestra una inserción de aminoácido después del número indicado en la numeración EU. Por ejemplo, ^281S significa que S se inserta entre las posiciones 281 y 282 en la numeración EU.

[Tabla 1]

POSICIÓN	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
256	P
280	K
339	T
385	H
428	L
434	W, Y, F, A, H

[Tabla 2]

POSICIÓN	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
221	Y, K
222	Y
223	E, K
224	Y, E
225	E, K, W

POSICIÓN	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
227	K, E, G
228	Y, K, G
230	E, G
232	K
233	R, S, M, T, W, Y, G
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G
235	Y, V, N, S, T, Q, D
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A
240	I, M, T
241	E, W, L
243	E, W
244	L
245	R
246	Y, H
247	D
248	Y
249	P, Q, Y, H
250	I, E, Q
251	T, D
252	Y, W, Q
254	H
255	E, Y, H
256	A

POSICIÓN	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C
258	D, Y, H, A
259	I, F, N
260	S, D, E, H, Y
262	L, E
263	I
264	F, A, I, T, N, S, D
265	R, P, G, A
266	I
267	K, E, A
268	E, M
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A
270	K, S, I, A
271	A, V, S, Y, I, T
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T
274	M, F, G, E, I, T, N
276	D, F, H, R, L, V, W, A
278	R, S, V, M, N, I, L, D
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I
281	D, Y
282	G, K, E, Y
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
284	T, L, Q, E
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A
287	S, H

POSICIÓN	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R
289	H
291	Q, H
292	Y, E, D
293	V
294	I, K, G
295	V, T
296	E, I, L
298	F, E, T, H
299	W, F, H, Y
300	K, A, G, V, M, Q, N, E
301	E
302	I
303	Y, E, A
304	N, T
305	A, H
306	Y
307	A, E, M, G, Q, H
308	A, R, F, C, Y, W, N, H
311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
312	A, P, H
315	T, H
316	K
317	A, P, H
318	N, T, R, L, Y
319	L, I, W, H, M, V, A

POSICIÓN	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
320	L, W, H, N
324	T, D
325	F, M, D
326	A
327	D, K, M, Y, H, L
328	G, A, W, R, F
329	K, R, W
330	G, W, V, P, H, F
331	L, F, Y
332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
333	L, F, M, A
334	A
335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
336	E, K
337	A
338	A
339	N, W
341	P
343	E, H, K, Q, R, T, Y
360	H, A
362	A
375	R
376	A, G, I, M, P, T, V
377	K
378	Q, D, N, W
380	A, N, S, T, Q, R, H

POSICIÓN	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
385	N, E
386	H
387	H, Q
414	A
423	N
424	A
426	H, L, V, R
427	N
428	F
429	Q
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
431	H, K
432	H
433	P
434	G, T, M, S,
435	K
436	I, L, T
437	H
438	K, L, T, W
440	K
442	K

[Tabla 3]

COMBINACIÓN DE ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H

COMBINACIÓN DE ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
H433K/N434F/Y436H
T307A/E380A
T307A/E380A/N434H
T307A/E380A/N434A
N434H/N315H
N434H/T289H
N434H/T370A/E380A
T250Q/M428L
T250Q/N434A
M252W/N434A
M252Y/N434A
T256A/N434A
T256D/N434A
T256E/N434A
T256S/N434A
P257I/Q311I
T307A/N434A
T307E/N434A
T307Q/N434A
V308P/N434A
L309G/N434A
Q311H/N434A
Q311R/N434A
N315D/N434A
A378V/N434A
E380S/N434A

COMBINACIÓN DE ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
E382V/N434A
S424E/N434A
M428L/N434A
N434A/Y436I
T437Q/N434A
T437R/N434A

[Tabla 4-1]

COMBINACIÓN DE ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
L234I/L235D
G236A/V308F/I332E
G236R/L328R
G236A/I332E/N434S
S239E/V264I/A330Y/I332E
S239E/V264I/I332E
S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239D/D265H/N297D/I332E
S239D/E272Y/1332E
S239D/E272S/I332E
S239D/E272I/I332E
S239D/N297D/I332E
S239D/K326T/I332E
S239Q/I332Q
S239Q/I332N
S239D/I332D
S239D/I332E
S239Q/I332E

COMBINACIÓN DE ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
S239E/I332E
F241W/F243W
F241Y/F243Y/V262T/V264T
F241W/F243W/V262A/V264A
F241L/V262I
F243L/V262I/V264W
F243L/K288D/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
F243L/K288D/R292P/Y300L/H435K
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
P245G/V308F
T250I/V259I/V308F
T250I/V308F
T250I/V308F/N434S
T250Q/V308F/M428L
T250Q/M428L
L251I/N434S
L251N/N434S
L251F/N434S
L251V/N434S
L251M/N434S
T252L/T254S/T256F
M252Y/S254T/T256E/N434M
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/V308F
M252Y/S254T/T256E/N434S

COMBINACIÓN DE ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
M252Y/S254T/T256E/N434A
M252Y/S254T/T256E/M428L
M252Y/S254T/T256E/T307Q
M252F/T256D
M252Y/T256Q
M252Y/P257L
M252Y/P257N
M252Y/V259I
M252Y/V279Q
M252Y/V308P/N434Y
M252Q/V308F
M252Y/V308F

La Tabla 4-2 es una continuación de la Tabla 4-1.

[Tabla 4-2]

M252Q/V308F/N434S
M252Y/V308F/M428L
M252Y/V308F/N434M
M252Y/V308F/N434S
M252Y/Y319I
M252Q/M428L/N434S
M252Y/M428L
M252Y/N434M
M252Y/N434S
M252Y/N434A
M252Y/N434Y
S254T/V308F

R255H/N434A
R255Q/N434S
R255H/N434S
T256V/V308F
T256P/Q311I
T256P/I332E
T256P/I332E/S440Y
T256P/E430Q
T256P/N434H
T256E/N434Y
T256P/S440Y
P257Y/V279Q
P257L/V279E
P257N/V279Q
P257N/V279E
P257N/V279Y
P257L/V279Q
P257N/^281S
P257L/^281S
P257N/V284E
P257N/L306Y
P257L/V308Y
P257L/V308F
P257N/V308Y
P257I/Q311I/N434H
P257L/Q311V
P257L/G385N

P257L/M428L
P257I/E430Q
P257I/N434H
P257L/N434Y
E258H/N434A
E258H/N434H
V259I/T307Q/V308F
V259I/V308F
V259I/V308F/Y319L
V259I/V308F/Y3191
V259A/V308F
V259I/V308F/N434M
V259I/V308F/N434S
V259I/V308F/M428L/N434S
V259I/V308F/M428L
V259I/Y319I
V259I/Y319I/N434S
V259I/M428L
V259I/M428L/N434S
V259I/N434S

La Tabla 4-3 es una continuación de la Tabla 4-2.

[Tabla 4-3]

V259I/N434Y
V264I/A330L/I332E
V264I/I332E
D265F/N297E/I332E
S267L/A327S

E272R/V279L
V279E/V284E
V279Q/L306Y
V279Y/V308F
V279Q/V308F
V279Q/G385H
^281S/V308Y
^281S/V308F
^281S/N434Y
E283F/V284E
V284E/V308F
V284E/G385H
K288A/N434A
K288D/H435K
K288V/H435D
T289H/N434A
T289H/N434H
L306I/V308F
T307P/V308F
T307Q/V308F/N434S
T307Q/V308F/Y319L
T307S/V308F
T307Q/V308F
T307A/E310A/N434A
T307Q/E380A/N434A
T307Q/M428L
T307Q/N434M

T307I/N434S
T307V/N434S
T307Q/N434S
T307Q/N434Y
V308T/L309P/Q311S
V308F/L309Y
V308F/Q311V
V308F/Y319F
V308F/Y319I/N434M
V308F/Y319I
V308F/Y319L
V308F/Y319I/M428L
V308F/Y319I/M428L/N434S
V308F/Y319L/N434S
V308F/I332E
V308F/G385H
V308F/M428L/N434M
V308F/M428L
V308F/M428L/N434S
V308P/N434Y
V308F/N434M
V308F/N434S
V308F/N434Y
Q311G/N434S
Q311D/N434S
Q311E/N434S
Q311N/N434S

La Tabla 4-4 es una continuación de la Tabla 4-3.

[Tabla 4-4]

Q311Y/N434S
Q311F/N434S
Q311W/N434S
Q311A/N434S
Q311K/N434S
Q311T/N434S
Q311R/N434S
Q311L/N434S
Q311M/N434S
Q311V/N434S
Q311I/N434S
Q311A/N434Y
D312H/N434A
D312H/N434H
L314Q/N434S
L314V/N434S
L314M/N434S
L314F/N434S
L314I/N434S
N315H/N434A
N315H/N434H
Y319I/V308F
Y319I/M428L
Y319I/M428L/N434S
Y319I/N434M
Y319I/N434S

L328H/I332E
L328N/I332E
L328E/I332E
L328I/I332E
L328Q/I332E
L328D/I332E
L328R/M428L/N434S
A330L/I332E
A330Y/I332E
I332E/D376V
I332E/N434S
P343R/E345D
D376V/E430Q
D376V/E430R
D376V/N434H
E380A/N434A
G385R/Q386T/P387R/N389P
G385D/Q386P/N389S
N414F/Y416H
M428L/N434M
M428L/N434S
M428L/N434A
M428L/N434Y
H429N/N434S
E430D/N434S
E430T/N434S
E430S/N434S

E430A/N434S
E430F/N434S
E430Q/N434S
E430L/N434S
E430I/N434S
A431T/N434S

Tabla 4-5 es una continuación de la Tabla 4-4.

[Tabla 4-5]

A431S/N434S
A431G/N434S
A431V/N434S
A431N/N434S
A431F/N434S
A431H/N434S
L432F/N434S
L432N/N434S
L432Q/N434S
L432H/N434S
L432G/N434S
L432I/N434S
L432V/N434S
L432A/N434S
H433K/N434F
H433L/N434S
H433M/N434S
H433A/N434S
H433V/N434S

H433K/N434S
H433S/N434S
H433P/N434S
N434S/M428L
N434S/Y436D
N434S/Y436Q
N434S/Y436M
N434S/Y436G
N434S/Y436E
N434S/Y436F
N434S/Y436T
N434S/Y436R
N434S/Y436S
N434S/Y436H
N434S/Y436K
N434S/Y436L
N434S/Y436V
N434S/Y436W
N434S/Y436I
N434S/T437I

Tales alteraciones de aminoácido se pueden introducir apropiadamente usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, las alteraciones en el dominio Fc de IgG1 humana intacta se describen en Drug Metab Dispos. Enero de 2007. 35(1): 86-94; Int Immunol. 18 de diciembre de 2006, (12): 1759-69; J Biol Chem. 2 de marzo de 2001, 276(9): 6591-604; J Biol Chem. (2007) 282(3): 1709-17; J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80; J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71; Molecular Cell, Vol. 7, 867-877, Abril, 2001; Nat Biotechnol. 15 de julio de 1997, (7): 637-40; Nat Biotechnol. 23 de octubre de 2005, (10): 1283-8; Proc Natl Acad Sci EE.UU. 5 de diciembre de 2006, 103(49): 18709-14; EP 2154157; US 20070141052; WO 2000/042072; WO 2002/060919; WO 2006/020114; WO 2006/031370; WO 2010/033279; WO 2006/053301; y WO 2009/086320.

De acuerdo con el Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671, la actividad de unión a FcRn humano de la IgG1 humana intacta en el intervalo de pH ácido (pH 6,0) es KD 1,7 micromolar (microM), mientras que el intervalo de pH neutro la actividad es casi indetectable. En consecuencia, en una realización preferida, la molécula de unión al antígeno para usar en los procedimientos descritos en la presente incluye las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido es KD 20 micromolar o más fuerte y es idéntica o más fuerte en el intervalo de pH neutro que en el de la IgG humana intacta. En una realización más preferida, la molécula de unión al antígeno incluye las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 2,0

micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido y KD 40 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. En una realización aún más preferida, la molécula de unión al antígeno incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 0,5 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido y KD 15 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. Los valores de KD anteriores se determinan mediante el procedimiento descrito en el Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (mediante la inmovilización de la molécula de unión al antígeno en un chip y la carga de FcRn humano como un analito).

La constante de disociación (KD) se puede usar como un valor de la actividad de unión a FcRn humano. Sin embargo, la actividad de unión a FcRn humano de la IgG humana intacta tiene poca actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro (pH 7,4), y por lo tanto es difícil calcular la actividad como KD. Los procedimientos para evaluar si la actividad de unión a FcRn humano es mayor que la de IgG humana intacta a pH 7,4 incluyen procedimientos de evaluación que comparan las intensidades de respuesta de Biacore después de cargar analitos en la misma concentración. Específicamente, cuando la respuesta después de cargar un chip de FcRn humano inmovilizado con una molécula de unión al antígeno a pH 7,4 es más fuerte que la respuesta después de cargar FcRn humano sobre un chip inmovilizado con IgG humana intacta a pH 7,4, la actividad de unión a FcRn Se considera que la molécula de unión al antígeno se considera más alta que la de la IgG humana intacta a pH 7,4,

El pH 7,0 también se puede usar como un intervalo de pH neutro. El uso de pH 7,0 como un pH neutro puede facilitar la interacción débil entre FcRn humano y el dominio de unión a FcRn. Como la temperatura empleada en la condición de ensayo, la afinidad de unión se puede evaluar a cualquier temperatura de 10 grados C a 50 grados C. Con preferencia, una temperatura de 15 grados C a 40 grados C se emplea para determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Con más preferencia, cualquier temperatura de 20 grados C a 35 grados C, como cualquiera de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, y 35 grados C también se emplea para determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Una temperatura a 25 grados C descrita en el Ejemplo 5 es uno del ejemplo para la realización de esta invención. En una realización preferida, una interacción entre el FcRn humano y el dominio de unión a FcRn se puede medir a pH 7,0 y a 25 grados C descrito en el Ejemplo 5. La afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno a FcRn humano se puede medir por Biacore descrito en el Ejemplo 5.

En una realización más preferida, las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente tienen la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C que es mayor que IgG humana intacta. En una realización más preferida, la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C es 28 veces más fuerte que IgG humana intacta o más fuerte que la KD 3,2 micromolar. En una realización más preferida, actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C es 38 veces más fuerte que IgG humana intacta o más fuerte que la KD 2,3 micromolar.

Una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana intacta con preferencia se usa como la IgG humana intacta para un fin de una IgG humana intacta de referencia para comparar con las moléculas de unión al antígeno por su actividad de unión de FcRn humano o actividad in vivo. Con preferencia, se puede usar apropiadamente una molécula de unión al antígeno de referencia que comprende el mismo dominio de unión al antígeno como una molécula de unión al antígeno del dominio Fc de IgG humana de interés e intacta como un dominio de unión a FcRn humano. Con más preferencia, una IgG1 humana intacta se usa para un fin de una IgG humana intacta de referencia para comparar con las moléculas de unión al antígeno por su actividad de unión de FcRn humano o actividad in vivo.

Más específicamente, las moléculas de unión al antígeno con el efecto de largo plazo sobre la actividad para eliminar antígeno en plasma descrito en la presente invención tienen actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C dentro de un intervalo de 28 veces a 440 veces mayor que IgG1 humana intacta o KD dentro de un intervalo de 3,0 micromolar a 0,2 micromolar. Una concentración de antígeno en plasma a largo plazo se determina mediante la medición de la concentración de antígeno total o libre en plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno a 2, 4, 7, 14, 28, 56, o 84 días después de la administración de una molécula de unión al antígeno a fin de evaluar el efecto de largo plazo de la molécula de unión al antígeno de la presente invención sobre la actividad para eliminar antígeno en plasma. Se puede determinar si la reducción de la concentración de antígeno en plasma o relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se obtiene con la molécula de unión al antígeno descrita en la presente mediante la evaluación de la reducción en uno o más de los puntos de tiempo descritos anteriormente.

Aún más específicamente, las moléculas de unión al antígeno con efecto a corto plazo sobre la actividad para eliminar el antígeno en plasma descrito en la presente invención tienen actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C 440 veces mayor que la IgG humana intacta o KD más fuerte que 0,2 micromolar. Una concentración de antígeno en plasma a largo plazo se determina mediante la medición de la concentración de antígeno total o libre en plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno t 15 min, 1, 2, 4, 8,12, o 24 horas después de la administración de una molécula de unión al antígeno a fin de evaluar el efecto de corto plazo de la molécula de unión al antígeno de la presente invención sobre la actividad para eliminar antígeno en plasma.

Los procedimientos descritos en la presente son aplicables a cualquiera de las moléculas de unión al antígeno independientemente del tipo de antígeno blanco.

Los antígenos que son reconocidos por moléculas de unión al antígeno tales como anticuerpos de interés en los procedimientos de la presente invención no están particularmente limitados. Tales anticuerpos de interés pueden reconocer cualquier antígeno. Los anticuerpos cuya farmacocinética se mejora mediante los procedimientos de la presente invención incluyen, por ejemplo, proteínas receptoras (receptores unidos a membrana y receptores solubles), anticuerpos que reconocen un antígeno de membrana tal como marcadores de superficie celular y anticuerpos que reconocen un antígeno soluble tal como citoquinas. Los ejemplos específicos de un antígeno reconocido por el anticuerpo cuya farmacocinética ha sido mejorada por los procedimientos descritos en la presente invención incluyen, por ejemplo: 17-IA, 4-1 BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, receptor de adenosina A1, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM 15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, adiponectina, ADP ribosil ciclasa-1, aFGF, AGE, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alergeno, alfal-antiquimotripsina, alfal-antitripsina, alfa-sinucleína, antagonista alfa-V/beta-1, aminina, amilina, amiloide beta, región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina amiloide, región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina amiloide, Andrógeno, ANG, angiotensinógeno, ligando-2 de angiopoietina, anti-Id, antitrombina III, ántrax, APAF-1, APE, APJ, apo A1, apo amiloide A sérico, Apo-SAA, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, ASPARTIC, factor natriurético atrial, péptido natriurético atrial, péptidos natriuréticos atriales A, péptidos natriuréticos atriales B, péptidos natriuréticos atriales C, integrina av/b3, Axl, B7-1, B7-2, B7-H, BACE, BACE-1, antígeno protector de Bacillus anthracis, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, beta-2-microglobulina, betalactamasa, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, estimulador de linfocitos B (BlyS), BMP, BMP-2 (BMP-2a), BMP-3 (Osteogenina), BMP-4 (BMP-2b), BMP-5, BMP-6 (Vgr-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BMPR-II (BRK-3), BMPs, BOK, Bombesina, Factor neurotrófico derivado de hueso, hormona de crecimiento bovino, BPDE, ADN- BPDE, BRK-2, BTC, molécula de adhesión de células de linfocitos B, C10, inhibidor de C1, C1q, C3, C3a, C4, C5, C5a (complemento 5a), CA125, CAD-8, Cadherina-3, Calcitonina, cAMP, anhidrasa carbónica IX, antígeno carcinoembrionario (CEA), antigeno asociado con carcinoma, Cardiotrofina-1, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1/I-309, CCL11/Eotaxin, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL16/HCC-4, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL19/ELC, CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3-alfa, CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MPIF-1, CCL24/Eotaxina-2, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxina-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CCL3/M1P-1-alfa, CCL3L1/LD-78-beta, CCL4/MIP-1-beta, CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/10/MTP-1-gamma, CCR, CCR1, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD10, CD105, CD11a, CD11b, CD11c, CD123, CD13, CD137, CD138, CD14, CD140a, CD146, CD 147, CD148, CD 15, CD152, CD16, CD164, CD18, CD 19, CD2, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD26, CD27L, CD28, CD29, CD3, CD30, CD30L, CD32, CD33 (p67 proteins), CD34, CD37, CD38, CD3E, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD49b, CD5, CD51, CD52, CD54, CD55, CD56, CD6, CD61, CD64, CD66e, CD7, CD70, CD74, CD8, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD105, CD158a, CEA, CEACAM5, CFTR, cGMP, CGRP receptor, CINC, CKb8-1, Claudin18, CLC, toxina de Clostridium botulinum, toxina de Clostridium difficile, toxina de Clostridium perfringens, c-Met, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, factor de complemento 3 (C3), factor de complemento D, globulina de unión de corticoide, receptor del factor estimulante de colonia 1, COX, C-Ret, CRG-2, CRTH2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1/Fractalkina, CX3CR1, CXCL, CXCL1/Gro-alfa, CXCL10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1-alfa/beta, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRAK, CXCL15/Lungkine. CXCL16, CXCL16, CXCL2/Gro-beta CXCL3/Gro-gamma, CXCL3, CXCL4/PF4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CXCL9/Mig, CXCLlO/IP-10, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, cistatina C, Antígeno asociado al tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor de aceleración de decaimiento, ligando proteico 4 tipo Delta, des (1-3) -IGF-1 (IGF-1 cerebral), Dhh, DHICA oxidasa, Dickkopf-1, digoxina, Dipeptidil Peptidasa IV, DK1, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), proteína 7 que contiene dominio tipo EGF, elastasa, elastina, EMA, EMMPRIN, ENA, ENA-78, endodosialina, receptor de endotelina, endotoxina, encefalinasa, eNOS, Eot, Eotaxina, Eotaxina-2, eotaxini, EpCAM, Efrina B2/EphB4, receptor de tirosina quinasa Epha2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor ErbB2, receptor de tirosina quinasa ErbB3, ERCC, eritropoyetina (EPO), receptor de eritropoyetina, E-selectina, ET-1, Exodus-2, proteína F de RSV, F10, F11, F12, F13, F5, F9, Factor Ia, Factor IX, Factor Xa, Factor VII, Factor VIII, Factor VIIIc, Fas, FcalphaR, FcepsilonRI, FcgammaIIb, FcgammaRI, FcgammaRIIa, FcgammaRIIIa, FcgammaRIIIb, FcRn, FEN-1, Ferritina, FGF-3, FGF-8, FGF-acidic, FGF-basic, FGFR, FGFR-3, fibrina, proteína de activación de fibroblasto (FAP), factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos-10, fibronectina, FL, FLIP, Flt-3, ligando FLT3, receptor de folato, hormona foliculoestimulante (FSH), Fractalkina (CX3C), cadena pesada libre, cadena liviana libre, FZD1, FZD10, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, G-CSF, G-CSF receptor, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-15 (MIC-1), GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14/CDMP-1), GDF-6 (BMP-13/CDMP-2), GDF-7 (BMP-12/CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDNF, Gelsolina, GFAP, GF-CSF, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GF-beta1, GH glicoproteína, de la cubierta gH, GITR, glucagon, receptor de glucagon, receptor del péptido 1 tipo glucagon, Glut 4, glutamato carboxipeptidasa II, receptores de la hormona glicoproteica, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), Glypican-3, GM-CSF, receptor GM-CSF, gp130, Gp140, gp72, granulocito-CSF (G-CSF), GRO/MGSA, factor de liberación de la hormona del crecimiento, GRO-beta, GRO-gamma, H. pylori, Hapteno (NP-cap o NIP-cap) HB-EGF, HCC, HCC 1, glicoproteína de la cubierta de gB de HCMV, HCMV UL, factor de crecimiento hemopoyético (HGF), Hep B gp120, heparanasa, cofactor de heparina II, factor de crecimiento hepático, antígeno protector de Bacillus anthracis, glicoproteína E2 del virus de la hepatitis C, hepatitis E, Hepcidin, Her1, Her2/neu (ErbB - 2), Her3 (ErbB - 3), Her4 (ErbB - 4), glicoproteína gB del virus del herpes simple

(HSV), HGF, HGFA, Antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), proteínas de la envoltura del VIH tales como GP120, bucle MIP gV 120 V3 del VIH, HLA, HLA-DR, HM1,24, HMFG PEM, HMGB-1, HRG, Hrk, HSP47, Hsp90, glicoproteína gD de HSV, miosina cardíaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humano (hGH), albúmina sérica humana, activador de plasminógeno tipo tisular humano (t-PA), Huntingtin, HVEM, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IgA, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión de IGF, IGF-1, IGF-1 R, IGF-2, IGFBP, IGFR, IL, IL-1, IL-10, receptores IL-10, receptores IL-11, IL-11, receptores IL-12, IL-12, receptores IL-12, IL-13, receptores IL-13, IL-15, receptores IL-15, IL-16, receptores de IL-16, IL-17, -11, receptores IL-12, IL-12, receptores IL-12, IL-13, receptores IL-13, IL-15, receptores IL-15, IL-16, receptores IL-17, IL-18 (IGIF), receptores de IL-18, IL-1alfa, IL-1beta, receptores de IL-1, IL-2, receptores de IL-2, IL-20, receptores de IL-20, IL-21, receptores de IL-21, IL-23, receptores de IL-23, receptores de IL-2, IL-3, receptores de IL-3, IL-31, receptores de IL-31, receptores de IL-3, IL-4, receptores de IL-4, IL-5, receptores de IL-5, IL-6, receptores de IL-6, IL-7, receptores de IL-7, IL-8, receptores de IL-8, IL-9, receptores de IL-9, complejo inmune de inmunoglobulina, Inmunoglobulinas, INF-alfa, receptores INF-alfa, INF-beta, receptores INF-beta, INF-gamma, receptores INF-gamma, IFN tipo-I, receptor IFN tipo I, influenza, inhibina, inhibina alfa, Inhibin beta, iNOS, insulina, cadena A de la insulina, cadena B de insulina, factor de crecimiento tipo insulina 1, factor de crecimiento tipo insulina 2, proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina, integrina, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/Beta1, integrina alfa-V/beta-3, integrina alfa-V/beta-6, integrina alfa4/beta7, integrina alfa5/betal, integrina alfa5/beta3, integrina alfa5/beta6, integrina alfa-delta (alfaV), integrina alfa-theta, integrina beta1, integrina beta2, integrina beta3(GPIIb-IIIa), IP-10, I-TAC, JE, calicreína, Calicreína 11, Calicreína 12, Calicreína 14, Calicreína 15, Calicreína 2, Calicreína 5, Calicreína 6, Calicreína L1, Calicreína L2, Calicreína L3, Calicreína L4, kallistatin, KC, KDR, Factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), Factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, receptor tipo inmunoglobulina citolitica, kit ligando (KL), Kit tirosina quinasa, laminina 5, LAPP (Amilina, polipéptido de islote-amiloide), LAP (TGF-1), péptido asociado a latencia, TGF-1 latente, TGF-1 bpl latente, LBP, LDGF, LDL, receptor de LDL, LECT2, Lefty, Leptina, Hormona luteinizante (LH), antígeno Lewis-Y, antígeno relacionado con Lewis-Y, LFA-1, LFA-3, receptores LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-selectina LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, tensioactivo pulmonar, hormona luteinizante, linfotactina, Receptor Beta de linfotoxina, receptor de lisosfingolipido Mac-1, macrófago-CSF (M-CSF), MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, maspina, MCAM, MCK-2, MCP, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-1 (MCAF), M-CSF, MDC, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), megsin, Mer, MET familia de receptores de tirosina quinasa, METALOPROTEASAS, glucoproteína de membrana OX2, mesotelina, receptor MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), proteína microbiana, MIF, MIG, MIP, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, MIP-3 alfa, MIP-3 beta, MIP-4, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, proteína atrayente de monocitos, factor inhibidor de colonias de monocitos, péptido asociado a gonadotropina de ratón, MPIF, Mpo, MSK, MSP, MUC-16, MUC18, mucina (barro), sustancia inhibidora de muelleria, Mug, MuSK, glucoproteína asociada a mielina, factor inhibidor de progenitor mieloide-1 (MPIF-I), NAIP, Nanocuerpo NAP-2, NCA 90, NCAD, N-Cadherina, NCAM, Neprilisina, molécula de adhesión de células neurales, neuroserpina, factor de crecimiento neuronal (NGF), Neurotrofina-3, Neurotrofina-4, Neurotrofina-6, Neuropilina 1, Neurturina, NGF-beta, NGFR, NKG20, N-metionil hormona de crecimiento, nNOS, NO, Nogo-A, receptor Nogo, proteína no estructural tipo 3 (NS3) del virus de hepatitis Cs, NOS, Npn, NRG-3, NT, NT-3, NT-4, NTN, OB, OGG1, Oncostatina M, OP-2, OPG, OPN, OSM, receptores OSM, factores osteoinductores, osteopontina, OX40L, OX40R, LDL oxidado, p150, p95, PADPr, hormona paratiroides, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina, PCNA, PCSK9, PDGF, receptor PDGF, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-D, PDK-1, PECAM, PEDF, PEM, PF-4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIGF, PIN, PLA2, Factor de crecimiento placentario, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), lactógeno placentario, inhibidor-1 del activador del plasminógeno, factor de crecimiento plaquetario, plgR, PLP, cadenas de poli glicol de diferente tamaño (por ejemplo, PEG-20, PEG-30, PEG40), PP14, precalicreína, proteína de prión, procalcitonina, proteína de muerte celular programada 1, proinsulina, prolactina, Proproteína converasa PC9, prorelaxina, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), Proteína A, Proteína C, Proteína D, Proteína S, Proteína Z, PS, PSA, PSCA, PsmAr, PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, ligando 1 de glicoproteína selectina-P, R51, RAGE, RANK, RANKL, RANTES, relaxina, cadena de Relaxina A, cadena de Relaxina B, renina, Virus respiratorio sincitial (VSR) F, Ret, reticulón 4, factores reumatoides, RLI P76, RPA2, RPK-1, RSK, RSV Fgp, S100, RON-8, SCF/KL, SCGF, esclerostina, SDF-1, SDF1 alfa, SDF1 beta, SERINE, amiloide sérico P, albúmina sérica, sFRP-3, Shh, toxina II tipo Shiga, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, receptor esfingosina 1-fosfato 1, ácido lipoteicoico Staphylococcal, Stat, STEAP, STEAP-II, factor de células madre (SCF), estreptoquinasa, superóxido dismutasa, syndecan-1, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína asociada con el tumor-72), TARC, TB, TCA-3, receptor alfa/beta de células T, TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, Tenascina, TERT, fosfatasa alcalina tipo PLAP testicular, TfR, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta Pan Specific, TGF-beta RII, TGF-beta RIIb, TGF-beta RIII, TGF-beta RI (ALK-5), TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, TGF-I, Trombina, trombopoyetina (TPO), receptor de linfoproteína estromal tímica, timo Ck-1, hormona estimulante de la tiroides (TSH), tiroxina, globulina de unión a la tiroxina, Tie, TIMP, TIQ, Factor de Tejido, inhibidor de la proteasa del factor tisular, proteína del factor tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF receptor I, TNF receptor II, TNF-alfa, TNF-beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2/DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1/LIT/TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF12A, TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR/ HveA/LIGHT R/TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ/TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF R1 CD120a/p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22

(DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2 Ligando/TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK Ligando ODF/OPG Ligand), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 Ligando/DR3 Ligando), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT HVEM Ligando/LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI). TNFSF18 (GITR Ligando AITR Ligando/TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina/DIF/TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa/TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC/p33), TNFSF4 (OX40 Ligando gp34/TXGP1), TNFSF5 (CD40 Ligando CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP), TNFSF6 (Fas Ligando Apo-1 Ligando/APT1 Ligando), TNFSF7 (CD27 Ligando CD70), TNFSF8 (CD30 Ligando CD153), TNFSF9 (4-1 BB Ligando CD137 Ligando), TNF-alfa, TNF-beta, TNIL-I, metabolito tóxico, TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferrina, factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, NMB glicoproteína de transmembrana, transtiretina, TRF, Trk, TROP-2, glicoproteína trofoblástica, TSG, TSLP, factor de necrosis tumoral (TNF), antígeno CA 125 asociado a tumor, antígeno asociado a tumor que expresa carbohidrato relacionado con Lewis Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, uroquinasa, VAP-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vaspina, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherina, VE-Cadherina-2, VEFGR-1 (flt-1), VEFGR-2, receptor VEGF (VEGFR), VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos virales, receptor VitB 12, receptor de vitronectina, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina VNR, factor de von Willebrand (vWF), WIF-1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, XCL1, XCL2/SCM-1-beta, XCL1/Linfotactina, XCR1, XEDAR, XIAP, y XPD.

Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente son capaces de reducir la concentración total de antígeno en plasma de los antígenos descritos anteriormente. Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente son también capaces de eliminar virus, bacterias y hongos del plasma mediante la unión a componentes estructurales de virus, bacterias y hongos. En particular, la proteína F del RSV, ácido lipoteicoico estafilocóccico, toxina de Clostridium difficile, toxina II de Shiga, antígeno protector de Bacillus anthracis y glicoproteína E2 del virus de la hepatitis C se pueden utilizar como componentes estructurales de virus, bacterias y hongos.

Aunque los procedimientos de la presente descripción no están limitados por ninguna teoría particular, la relación entre la reducción (deterioro) de la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro y/o el aumento (mejora) de la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro y el aumento en el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única, debido a la facilitación de la captación de las moléculas de unión al antígeno en las células, y la mejora de eliminación de antígeno del plasma se puede explicar de la siguiente manera.

Por ejemplo, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo es un anticuerpo que se une a un antígeno de membrana, el anticuerpo administrado en el cuerpo se une al antígeno y luego capta por medio de internalización en endosomas en las células junto con el antígeno mientras se mantiene el anticuerpo unido al antígeno. A continuación, el anticuerpo se transloca a lisosomas mientras el anticuerpo se mantiene unido al antígeno y el anticuerpo se degrada por el lisosoma junto con el antígeno. La eliminación mediada por la internalización del plasma se denomina eliminación dependiente de antígeno, y se ha dado a conocer tal eliminación con numerosas moléculas de anticuerpo (Drug Discov Today, 2006, 11: 1-2): 81-8). Cuando una molécula de anticuerpo IgG única se une a antígenos de una manera divalente, la única molécula de anticuerpo se internaliza mientras el anticuerpo se mantiene unido a las dos moléculas de antígeno y se degrada en el lisosoma. Por consiguiente, en el caso de anticuerpos típicos, una molécula de anticuerpo IgG no puede unirse a tres o más moléculas de antígeno. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo IgG única que tiene una actividad neutralizante no puede neutralizar tres o más moléculas de antígeno.

La retención relativamente prolongada (eliminación lenta) de las moléculas de IgG en el plasma se debe a la función de FcRn humano que se conoce como un receptor de rescate de moléculas de IgG. Cuando se incorporan a endosomas por pinocitosis, las moléculas de IgG se unen a FcRn humano expresado en los endosomas en la condición ácida en los endosomas. Mientras que las moléculas de IgG que no se unen a FcRn humano se transfieren a los lisosomas donde se degradan, las moléculas de IgG que están unidas al FcRn humano se translocan a la superficie celular y vuelven de nuevo al plasma mediante la disociación del FcRn humano en la condición neutra en el plasma.

De forma alternativa, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo que se une a un antígeno soluble, el anticuerpo administrado en el cuerpo se une al antígeno y luego es captado por las células mientras el anticuerpo se mantiene unido al antígeno. Muchos anticuerpos captados por las células se liberan al exterior de la célula a través de FcRn. Sin embargo, debido a que los anticuerpos se liberan al exterior de la célula, con los anticuerpos mantenidos unidos a antígenos, los anticuerpos no se pueden unir a antígenos de nuevo. En consecuencia, de forma similar a los anticuerpos que se unen a antígenos de membrana, en el caso de anticuerpos típicos, una molécula de anticuerpo IgG no se puede unir a tres o más moléculas de antígeno.

Los anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH, que se unen fuertemente a un antígeno en condiciones neutras en el plasma, pero se disocian del antígeno en condiciones ácidas en el endosoma (anticuerpos que se unen en condiciones neutras pero se disocian en condiciones ácidas) se pueden disociar del antígeno en el

endosoma. Tales anticuerpos de unión al antígeno dependiente del pH se pueden unir a los antígenos de nuevo cuando se reciclan al plasma mediante FcRn después de la disociación del antígeno; por lo tanto, cada anticuerpo se puede unir repetidamente a un número de antígenos. Además, el antígeno unido a la molécula de unión al antígeno se disocia en el endosoma y no se recicla al plasma. Esto facilita la captación de antígeno mediada por moléculas de unión al antígeno en las células. De este modo, la administración de una molécula de unión al antígeno puede aumentar la eliminación del antígeno y, de este modo, reducir la concentración de antígeno en plasma.

La captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células también se puede facilitar al conferir la actividad de unión a FcRn humano en condiciones neutras (pH 7,4) a un anticuerpo que se une a un antígeno de una manera dependiente del pH (se une en condiciones neutras pero se disocia en condiciones ácidas). En consecuencia, la administración de una molécula de unión al antígeno puede aumentar la eliminación de antígeno y de este modo reduce la concentración de antígeno en plasma. Normalmente, tanto el anticuerpo como el complejo antígeno-anticuerpo son captados en las células mediante endocitosis no específica, y luego se transportan a la superficie celular mediante unión a FcRn en condiciones ácidas en el endosoma. El anticuerpo y el complejo antígeno-anticuerpo se reciclan al plasma mediante la disociación de FcRn en la condición neutra sobre la superficie celular. Por tanto, cuando un anticuerpo que presenta una dependencia suficiente del pH en la unión al antígeno (se une en condiciones neutras pero se disocia en condiciones ácidas) se une al antígeno en el plasma y luego se disocia del antígeno unido en el endosoma, se supone que la velocidad de eliminación del antígeno es igual a la velocidad de captación del antígeno en las células mediante endocitosis no específica. Por otra parte, cuando la dependencia del pH es insuficiente, el antígeno que no se disoció en el endosoma también se recicla al plasma. Mientras tanto, cuando la dependencia del pH es suficiente, la etapa determinante de la velocidad en la eliminación del antígeno es la captación en las células mediante endocitosis no específica. Se supone que parte de FcRn está localizada en la superficie celular porque FcRn transporta anticuerpos desde el endosoma a la superficie celular.

Los presentes inventores asumieron que las inmunoglobulinas tipo IgG, que son una de las moléculas de unión al antígeno, normalmente tienen poca capacidad de unión FcRn en el intervalo de pH neutro, pero las que exhiben la capacidad de unión a FcRn en el intervalo de pH neutro podrían unirse a FcRn en la superficie celular y, por lo tanto, son captados en las células de una manera dependiente de FcRn mediante la unión a FcRn de la superficie celular. La velocidad de captación mediada por FcRn en las células es más rápida que la velocidad de captación en las células por endocitosis no específica. De este modo, la velocidad de eliminación del antígeno también se puede acelerar adicionalmente al conferir la capacidad de unión a FcRn en el intervalo de pH neutro. Específicamente, una molécula de unión al antígeno que tiene capacidad de unión a FcRn en el intervalo de pH neutro transporta un antígeno dentro de las células más rápidamente que la inmunoglobulina tipo IgG típica (intacta humana) y luego la molécula de unión al antígeno se disocia del antígeno en el endosoma. La molécula de unión al antígeno se recicla a la superficie de la célula o plasma, y de nuevo se une a otro antígeno y es captada por las células a través de FcRn. La velocidad de este ciclo se puede acelerar mejorando la capacidad de unión a FcRn en el intervalo de pH neutro, de este modo se acelera la velocidad de eliminación de antígeno del plasma. Además, la eficiencia también se puede mejorar mediante la reducción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro. Además, se asume que el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única aumenta con un número de ciclos creciente obtenido por una molécula de unión al antígeno única. La molécula de unión al antígeno de la presente descripción comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn. Debido a que el dominio de unión a FcRn no afecta la unión de antígeno, o en vista del mecanismo descrito anteriormente, se puede esperar la facilitación de la captación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno en las células independiente del tipo de antígeno, y como un resultado aumenta la velocidad de eliminación de antígeno mediante la reducción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido (capacidad de unión) a menos que en el intervalo de pH neutro y/o aumento de su actividad de unión a FcRn en el pH de plasma.

<Sustancias que sirve como una molécula de unión al antígeno>

Además, la presente descripción proporciona moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro y cuya actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido es menor que en el intervalo de pH neutro. Los ejemplos específicos de moléculas de unión al antígeno incluyen los que tienen actividad de unión a FcRn humano a pH 5,8 a pH 6,0 y pH 7,4, que se supone son el pH in vivo del endosoma temprano y plasma, respectivamente, y cuya actividad de unión al antígeno es menor a pH 5,8 que a pH 7,4. Una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno es menor a pH 5,8 que a pH 7,4 también se puede denominar como una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno es más fuerte a pH 7,4 que a pH 5,8.

Las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción que tiene actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro con preferencia son moléculas de unión al antígeno que también tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido y actividad de unión a FcRn humano más fuerte que una IgG humana intacta en el intervalo de pH neutro. La relación de actividad de unión no está limitada, siempre que su actividad de unión a FcRn humano es incluso más fuerte a pH 7,4.

De acuerdo con el Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671, la actividad de unión a FcRn humano de IgG1

humana intacta es KD 1,7 micromolar en el intervalo de pH ácido (pH 6,0), mientras que la actividad es casi indetectable en el intervalo de pH neutro. En consecuencia, en una realización preferida, las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que tiene actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro incluyen moléculas de unión al antígeno que tienen una actividad de unión a FcRn humano de KD 20 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido, que es igual a o más fuerte que la de la IgG humana intacta en el intervalo de pH neutro. En una realización más preferida, las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 2,0 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido y KD 40 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. En una realización aún más preferida, las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 0,5 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido y KD 15 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. Los valores de KD anteriores se determinan mediante el procedimiento descrito en el Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (mediante la inmovilización de la molécula de unión al antígeno en un chip y la carga de FcRn humano como un analito).

La presente descripción proporciona una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro, donde una actividad de unión al FcRn humano y al antígeno menor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro es mayor que la KD 3,2 micromolar. La presente descripción también proporciona una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro, donde una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro es 28 veces mayor que la de una IgG humana intacta. Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente tienen actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C que es mayor que la IgG humana intacta. En una realización más preferida, la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C es 28 veces mayor que la IgG humana intacta o más fuerte que la KD 3,2 micromolar.

La presente descripción proporciona una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde una actividad de unión a FcRn normal en el intervalo de pH neutro es mayor que KD 2,3 micromolar. La presente descripción también proporciona una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, donde una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es 38 veces mayor que la de una IgG humana intacta.

En la presente memoria, el intervalo de pH ácido normalmente se refiere a pH 4,0 a pH 6,5. El intervalo de pH ácido es con preferencia un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 5,5 a pH 6,5, con preferencia seleccionado de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, y 6,5, con particular preferencia pH 5,8 a pH 6,0, que es cercano al pH en el endosoma temprano in vivo. Entretanto, en la presente el intervalo de pH neutro normalmente se refiere a pH 6,7 a pH 10,0. El intervalo de pH neutro con preferencia es un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 7,0 a pH 8,0, con preferencia seleccionado de pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, y 8,0, con particular preferencia pH 7,4, que es cercano al pH plasmático in vivo (sangre). El pH 7,0 se puede usar como una alternativa a un pH 7,4 cuando es difícil evaluar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano debido a su baja afinidad a pH 7,4. Como una temperatura empleada en la condición de ensayo, una afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y FcRn humano se puede evaluar a cualquier temperatura de 10 grados C a 50 grados C. Con preferencia, una temperatura de 15 grados C a 40 grados C se emplea a fin de determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Con más preferencia, cualquier temperatura de 20 grados C a 35 grados C, como alguna de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, y 35 grados C también se emplea para determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Una temperatura a 25 grados C descrita en el Ejemplo 5 es un ejemplo para la realización de esta invención.

En una realización más preferida, la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C es 38 veces mayor que IgG humana intacta o más fuerte que KD 2,3 micromolar. Una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana intacta se usa como la IgG humana intacta para un fin de una IgG humana intacta de referencia para comparar con las moléculas de unión al antígeno por su actividad de unión de FcRn humano. Con más preferencia, una IgG1 humana intacta se usa con el fin de una IgG humana intacta de referencia para comparar con las moléculas de unión al antígeno por su actividad de unión de FcRn humano.

La presente descripción proporciona una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano donde una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano es más baja que una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia al animal no humano.

La presente descripción también proporciona una molécula de unión al antígeno en la que una concentración de antígeno en plasma después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano es más baja que una concentración de antígeno total en plasma obtenida del animal no humano al que no se administra la

molécula de unión al antígeno.

La concentración de antígeno total en plasma se puede reducir mediante la administración de la molécula de unión al antígeno de la presente invención en 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces y 1,000 veces o incluso mayor en comparación con la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia que comprende el dominio Fc de IgG humana intacta como un dominio de unión a FcRn humano o en comparación con cuando no se administra la molécula de dominio de unión al antígeno de la presente invención.

En otra realización, la presente descripción proporciona una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano en que una relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno (C) de la molécula de unión al antígeno que se calcula de la siguiente manera;

$$C=A/B,$$

Es más baja que una relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno (C') de una molécula de unión al antígeno que comprende el mismo dominio de unión al antígeno y dominio Fc de IgG humana intacta como un dominio de unión a FcRn humano que se calcula de la siguiente manera;

$$C'=A'/B',$$

donde;

A es una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano,

B es una concentración plasmática de una molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno al animal no humano,

A' es una concentración de antígeno total en plasma después de la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia al animal no humano,

B' es una concentración plasmática de una molécula de unión al antígeno después de la administración de una molécula de unión al antígeno de referencia al animal no humano.

La relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede reducir mediante la administración de la molécula de unión al antígeno de la presente invención en 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces y 1,000 veces o aun mayor en comparación con la administración de la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio Fc de IgG humana intacta como un dominio de unión a FcRn humano.

La reducción de la concentración de antígeno total en plasma o relación molar de antígeno/anticuerpo se puede evaluar como se describe en los Ejemplos 6, 8, y 13. Más específicamente, usando la línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano o línea 276 (Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104.), estas se pueden evaluar mediante un modelo de co-inyección de antígeno-anticuerpo o un modelo de infusión de antígeno en estado estacionario cuando la molécula de unión al antígeno no reacciona de forma cruzada con el antígeno equivalente de ratón. Cuando una molécula de unión al antígeno reacciona de forma cruzada con el equivalente de ratón, se puede evaluar simplemente inyectando una molécula de unión al antígeno a la línea 32 o línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano (Jackson Laboratories). En el modelo de co-inyección, se administra una mezcla de molécula de unión al antígeno y antígeno al ratón. En el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario, la bomba de infusión que contiene la solución de antígeno se implanta en el ratón para conseguir una concentración de antígeno en plasma constante, y luego se inyecta una molécula de unión al antígeno al ratón. La molécula de unión al antígeno de prueba se administra a la misma dosis. La concentración de antígeno total en plasma, concentración de antígeno libre en plasma y la concentración de molécula de unión al antígeno en plasma mide en el punto de tiempo apropiado usando un procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

La vía de administración de una molécula de unión al antígeno descrita en la presente se puede seleccionar de inyección intradérmica, intravenosa, intravítrea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral e intramuscular.

Más específicamente, las moléculas de unión al antígeno con efecto de largo plazo sobre la actividad para eliminar antígeno en plasma descritas en la presente invención tienen actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y 25 grados C dentro de un intervalo de 28 veces a 440 veces mayor que IgG1 humana intacta o KD dentro de un intervalo de 3,0 micromolar a 0,2 micromolar. Una concentración de antígeno en plasma a largo plazo se determina mediante la medición de la concentración de antígeno total o libre en plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno a 2, 4, 7, 14, 28, 56, o 84 días después de la administración de una molécula de unión al antígeno para evaluar el efecto de largo plazo de la molécula de unión al antígeno de la presente invención sobre la actividad para eliminar antígeno en plasma. Si se obtiene la reducción de la concentración de antígeno en plasma o relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno mediante la molécula de unión al antígeno descrita en la presente se puede determinar por la evaluación de la reducción de uno o más de los puntos

de tiempo descritos anteriormente.

Aún más específicamente, las moléculas de unión al antígeno con efecto a corto plazo sobre la eliminación de antígeno en plasma descritas en la presente invención tienen actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C 440 veces más fuerte que IgG humana intacta o KD más fuerte que 0,2 micromolar. Una concentración de antígeno en plasma a largo plazo se determina mediante la medición de la concentración de antígeno total o libre en plasma y relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno a 15 min, 1, 2, 4, 8, 12, o 24 horas después de la administración de una molécula de unión al antígeno a fin de evaluar el efecto a largo plazo de la molécula de unión al antígeno de la presente invención sobre la actividad de eliminación de antígeno en plasma.

Además, en una molécula de unión al antígeno de la presente invención que tiene una actividad de unión al antígeno menor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro, la relación de actividad de unión no está limitada, siempre que la actividad de unión al antígeno sea menor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro. Siempre que la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido sea aun ligeramente menor, la molécula de unión al antígeno es aceptable. En una realización preferida, las moléculas de unión al antígeno de la presente invención incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es dos veces o más alta que la de un pH 5,8. En una realización más preferida, las moléculas de unión al antígeno de la presente invención incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es diez veces o mayor que la de un pH 5,8. En una realización aún más preferida, las moléculas de unión al antígeno de la presente invención incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es 40 veces o mayor que la de un pH 5,8.

En forma específica, las moléculas de unión al antígeno de la presente invención incluyen, por ejemplo, las realizaciones descritas en el documento WO 2009/125825. Más específicamente, en una realización preferida, la molécula de unión al antígeno de la presente descripción tiene actividad de unión al antígeno a pH 5,8 que es menor que a pH 7,4, donde el valor de KD (pH5,8)/KD (pH7,4), que es una relación de KD para el antígeno a pH 5,8 y que un pH 7,4, con preferencia es 2 o mayor, con más preferencia 10 o mayor, y aún con más preferencia 40 o mayor. El límite superior del valor de KD (pH5,8)/KD (pH7,4) no está particularmente limitada, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 400, 1,000, o 10,000, siempre que la producción es posible usando las tecnología de los expertos en la técnica.

En otra realización preferida, la molécula de unión al antígeno de la presente descripción cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4, tiene un valor de k_d (pH5,8)/k_d (pH7,4), que es una relación de la k_d para el antígeno a pH 5,8 y la k_d para el antígeno a pH 7,4, que es 2 o mayor, con más preferencia 5 o mayor, incluso con más preferencia 10 o mayor, y aún con más preferencia 30 o mayor. El límite superior del valor k_d (pH5,8)/k_d (pH7,4) no está particularmente limitada, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 50, 100, o 200, siempre que la producción es posible usando las tecnologías de los expertos en la técnica.

Las condiciones diferentes del pH en que se mide la actividad de unión al antígeno y la actividad de unión a FcRn humano puede ser seleccionado apropiadamente por los expertos en la técnica, y las condiciones no está particularmente limitados; sin embargo, se llevan a cabo las mediciones, por ejemplo, en las condiciones de tampón MES y a 37 grados C, como se describe en loe Ejemplos. Además, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se puede determinar por procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore T100 (GE Healthcare) o similares, como se describe en loe Ejemplos.

Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente facilitan la captación de antígeno en las células. Las moléculas se disocian fácilmente del antígeno en el endosoma, y luego se libera al exterior de la célula mediante la unión al FcRn humano. Se supone que las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente se unen fácilmente a un antígeno en el plasma nuevamente. En consecuencia, por ejemplo, cuando la molécula de unión al antígeno de la presente invención es una molécula de unión al antígeno neutralizante, la reducción de la concentración de antígeno en plasma se puede facilita mediante la administración la molécula. Por consiguiente, una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido tiene una actividad de unión al antígeno menor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro; y una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro es probablemente una molécula de unión al antígeno que tiene farmacocinética superior y se puede unir a más antígenos por molécula.

En una realización preferida, tales moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro incluyen las que contienen un dominio de unión a FcRn humano que tiene la capacidad para unirse en forma directa y/o indirecta a FcRn humano. Cuando el dominio y tiene una capacidad de unión de FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro, se puede usar como tal. De forma alternativa, incluso si el dominio tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido pero exhibe actividad de unión a FcRn humano débil o nula en el intervalo de pH neutro, se puede usar después de la alteración de los aminoácidos del dominio para tener actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro. De forma alternativa, es posible aumentar la actividad de unión a FcRn humano mediante la alteración de aminoácidos en un dominio que ya tiene capacidad de unión de FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro. Tales moléculas de unión al antígeno incluyen, por ejemplo, los que tienen una secuencia de aminoácidos de dominio Fc de IgG que contiene una alteración de menos un aminoácido. La alteración de aminoácidos no está particularmente limitada; y la

alteración se puede realizar en cualquier sitio siempre que la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro sea más fuerte que antes de la alteración.

En forma específica, las alteraciones de aminoácido que producen la actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro incluyen, por ejemplo, alteraciones de aminoácidos de posiciones 221 a 225, 227, 228, 230, 232, 233 a 241, 243 a 252, 254 a 260, 262 a 272, 274, 276, 278 a 289, 291 a 312, 315 a 320, 324, 325, 327 a 339, 341, 343, 345, 360, 362, 370, 375 a 378, 380, 382, 385 a 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 a 438, 440, y 442 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original descrito anteriormente. Más específicamente, las alteraciones de aminoácido incluyen las que se hallan en los sitios (en numeración EU) mostrados en las Tablas, 1, 2, 6-1, 6-2, y 9. Las moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen las que comprenden una secuencia de aminoácidos que proviene de la alteración de al menos un aminoácido seleccionado de los de la las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 en la numeración EU.

En una realización preferida, tales alteraciones de aminoácido incluyen:

una sustitución de aminoácido Gly por Met en la posición 237;

una sustitución de aminoácido Pro por Ala en la posición 238;

una sustitución de aminoácido Ser por Lys en la posición 239;

una sustitución de aminoácido Lys por Ile en la posición 248;

una sustitución de aminoácidoThr por Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 250;

una sustitución de aminoácido Met por Phe, Trp, o Tyr en la posición 252;

una sustitución de aminoácido Ser por Thr en la posición 254;

una sustitución de aminoácido Arg por Glu en la posición 255;

una sustitución de aminoácido Thr por Asp, Glu, o Gln en la posición 256;

una sustitución de aminoácido Pro por Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, o Val en la posición 257;

una sustitución de aminoácido Glu por His a posición 258;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala en la posición 265;

una sustitución de aminoácido Asp por Phe en la posición 270;

una sustitución de aminoácido Asn por de Ala, o Glu en la posición 286;

una sustitución de aminoácido Thr por His en la posición 289;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala en la posición 297;

una sustitución de aminoácido Ser por Gly en la posición 298;

una sustitución de aminoácido Val por Ala en la posición 303;

una sustitución de aminoácido Val por Ala en la posición 305;

una sustitución de aminoácido Thr por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 307;

una sustitución de aminoácido Val por Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, o Thr en la posición 308;

una sustitución de aminoácido Leu o Val por Ala, Asp, Glu, Pro, o Arg en la posición 309;

una sustitución de aminoácido Gln por Ala, His, o Ile en la posición 311;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala, o His en la posición 312;

una sustitución de aminoácido Leu por Lys o Arg en la posición 314;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala, o His en la posición 315;

una sustitución de aminoácido Lys por Ala en la posición 317;

una sustitución de aminoácido Asn por Gly en la posición 325;

una sustitución de aminoácido Ile por Val en la posición 332;

una sustitución de aminoácido Lys por Leu en la posición 334;

una sustitución de aminoácido Lys por His en la posición 360;

una sustitución de aminoácido Asp por Ala en la posición 376;

una sustitución de aminoácido Glu por Ala en la posición 380;

una sustitución de aminoácido Glu por Ala en la posición 382;

una sustitución de aminoácido Asn o Ser por Ala en la posición 384;

una sustitución de aminoácido Gly por Asp o His en la posición 385;

una sustitución de aminoácido Gln por Pro en la posición 386;

una sustitución de aminoácido Pro por Glu en la posición 387;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala o Ser en la posición 389;

una sustitución de aminoácido Ser por Ala en la posición 424;

una sustitución de aminoácido Met por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, o Tyr en la posición 428;

una sustitución de aminoácido His por Lys en la posición 433;

una sustitución de aminoácido Asn por Ala, Phe, His, Ser, Trp, o Tyr en la posición 434;

y una sustitución de aminoácido Tyr por His o Phe en la posición 436 en la numeración EU.

El número de aminoácidos para alterar no está particularmente limitada; es posible alterar un aminoácido en solo un sitio único o dos o más sitios. Las combinaciones de dos o más alteraciones de aminoácido incluyen, por ejemplo, los mostrados en las Tablas 3, 4-1 a 4-5, 6-1, 6-2, y 9.

Entretanto, los dominios que ya tienen capacidad de unión de FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro incluyen, por ejemplo, los dominios de unión de FcRn humanos que comprenden al menos un aminoácido seleccionado de:

Met en la posición de aminoácido 237;

Ala en la posición de aminoácido 238;

Lys en el aminoácido en la posición 239;

Ile en la posición de aminoácido 248;

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

Phe, Trp, o Tyr en la posición de aminoácido 252;

Thr en la posición de aminoácido 254;

Glu en la posición de aminoácido 255;

Asp, Glu, o Gln en la posición de aminoácido 256;

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

His en la posición de aminoácido 258;

Ala en la posición de aminoácido 265;

Phe en la posición de aminoácido 270;

Ala o Glu en la posición de aminoácido 286;

His en la posición de aminoácido 289;

Ala en la posición de aminoácido 297;

Gly en la posición de aminoácido 298;

Ala en la posición de aminoácido 303;

Ala en la posición de aminoácido 305;

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

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

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

Ala, His, o Ile en la posición de aminoácido 311;

Ala o His en la posición de aminoácido 312;

Lys o Arg en la posición de aminoácido 314;

Ala o His en la posición de aminoácido 315;

Ala en la posición de aminoácido 317;

Gly en la posición de aminoácido 325;

Val en la posición de aminoácido 332;

Leu en la posición de aminoácido 334;

His en la posición de aminoácido 360;

Ala en la posición de aminoácido 376;

Ala en la posición de aminoácido 380;

Ala en la posición de aminoácido 382;

Ala en la posición de aminoácido 384;

Asp o His en la posición de aminoácido 385;

Pro en la posición de aminoácido 386;

Glu en la posición de aminoácido 387;

Ala o Ser en la posición de aminoácido 389;

Ala en la posición de aminoácido 424;

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

Lys en la posición de aminoácido 433;

Ala, Phe. His, Ser, Trp, o Tyr en la posición de aminoácido 434;

y His o Phe en la posición de aminoácido 436 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG original.

Un aminoácido en un sitio o aminoácidos en dos o más sitios pueden tener estos aminoácidos. Las combinaciones de aminoácidos en dos o más posiciones incluyen, por ejemplo, los mostrados en las Tablas 3, 4-1 a 4-5, 6-1, 6-2, y 9.

De forma alternativa, en una realización preferida, la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido es menor que en el intervalo de pH neutro incluye moléculas de unión al antígeno en las que al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno se reemplaza con histidina o un aminoácido no natural, o en que al menos se ha insertado una histidina o un aminoácido no natural. El sitio en el que se introduce la mutación de histidina o aminoácido no natural no está particularmente limitada y puede ser en cualquier sitio, siempre que la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido sea más débil que en el intervalo de pH neutro (el valor de KD (en el intervalo de pH ácido)/KD (en el intervalo de pH neutro) es mayor o la k_d (en el intervalo de pH ácido)/k_d (en el intervalo de pH neutro) es mayor) en comparación con antes de la sustitución. Los ejemplos incluyen regiones variables y las CDR de un anticuerpo en el caso de que la molécula de unión al antígeno sea un anticuerpo. El número de aminoácidos para reemplazar con histidina o aminoácido no natural y el

número de aminoácidos para insertar pueden ser determinado apropiadamente por los expertos en la técnica. Un aminoácido se puede reemplazar con histidina o aminoácido no natural, o se puede insertar un aminoácido o dos o más aminoácidos se pueden reemplazar con histidina o aminoácidos no naturales, o se pueden insertar dos o más aminoácidos. Además, aparte de las sustituciones de histidina o aminoácido no natural o inserción de histidina o de aminoácido no natural, también se pueden llevar a cabo simultáneamente la supresión, adición, inserción, y/o sustitución y similares de otros aminoácidos. Las sustituciones de histidina o aminoácido no natural o inserción de histidina o del aminoácido no natural se pueden llevar a cabo por un procedimiento aleatorio tal como barrido de histidina, que usa histidina en vez de alanina en el barrido de alanina conocido para los expertos en la técnica. Las moléculas de unión al antígeno cuya KD (pH5,8)/KD (pH7,4) o k_d (pH5,8)/k_d (pH7,4) está aumentada en comparación con antes de la mutación se pueden seleccionar de las moléculas de unión al antígeno en las que se ha introducido en forma aleatoria tal mutación de histidina o aminoácido no natural.

Las moléculas de unión al antígeno preferidas con mutación en histidina o en aminoácido no natural y cuya actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido es menor que en el intervalo de pH neutro incluyen, por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 después de la mutación en histidina o en el aminoácido no natural es equivalente a la actividad de unión al antígeno a pH 7,4 antes de la mutación en histidina o en aminoácido no natural. En la presente descripción, "una molécula de unión al antígeno después de la mutación de histidina o aminoácido no natural tiene una actividad de unión al antígeno que es equivalente a la de la molécula de unión al antígeno antes de la mutación de histidina o aminoácido no natural" significa que, cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno antes de la mutación de histidina o aminoácido no natural se ajusta como 100%, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno después de que la mutación de histidina o aminoácido no natural es al menos 10% o más, con preferencia 50% o más, con más preferencia 80% o más, y aún con más preferencia 90% o más. La actividad de unión al antígeno a pH 7,4 después de la mutación de histidina o aminoácido no natural puede ser más fuerte que la actividad de unión al antígeno a pH 7,4 antes de la mutación de histidina o aminoácido no natural. Cuando la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno disminuye debido a la sustitución por o inserción de histidina o aminoácido no natural, la actividad de unión al antígeno se puede ajustar mediante la introducción de sustitución, supresión, adición, y/o inserción y tal como de uno o más aminoácidos en la molécula de unión al antígeno de modo que la actividad de unión al antígeno es equivalente a la de antes de la sustitución por o inserción de histidina. La presente descripción también incluye las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión se ha vuelto equivalente como resultado de la sustitución, supresión, adición, y/o inserción de uno o más aminoácidos después de la sustitución por o inserción de histidina.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno es una sustancia que incluye una región constante del anticuerpo, en otra realización preferida de la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4, la presente descripción incluye procedimientos para la alteración de regiones constantes del anticuerpo contenidos en las moléculas de unión al antígeno. Los ejemplos de las regiones constantes del anticuerpo después de la alteración incluyen las regiones constantes descritas en los Ejemplos en el documento WO 2009/125825 (SEC ID NOs: 11, 12, 13, y 14).

Cuando la actividad de unión al antígeno de la sustancia de unión al antígeno a pH 5,8 se debilita en comparación con la de un pH 7,4 (cuando el valor de KD (pH5,8)/KD (pH7,4) está aumentado) mediante los procedimientos descritos anteriormente y como tal, generalmente se prefiere que el valor de KD (pH5,8)/KD (pH7,4) sea dos veces o más, con más preferencia cinco veces o más, y aun con más preferencia diez veces o más en comparación con el del anticuerpo original, pero no está particularmente limitada a este.

Además, la presente descripción proporciona moléculas de unión al antígeno que tienen sustitución por histidina o un aminoácido no natural de al menos un aminoácido en uno de los sitios descritos a continuación. Las posiciones de aminoácidos se muestran de acuerdo con la numeración de Kabat (Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Cadena pesada: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b, y H102

Cadena liviana: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92, y L94

De estos sitios de alteración, se considera que H32, H61, L53, L90, y L94 son sitios de alteración muy generales.

En forma específica, las combinaciones preferidas de sitios por sustitución por histidina o aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, la combinación de H27, H31, y H35; la combinación de H27, H31, H32, H35, H58, H62, y H102; la combinación de L32 y L53; y la combinación de L28, L32, y L53. Además, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución en las cadenas pesadas y livianas incluyen, por ejemplo, la combinación de H27, H31, L32, y L53.

Una molécula de unión al antígeno de la presente descripción puede tener otras propiedades, y por ejemplo puede ser una molécula de unión al antígeno agonista o antagonista, siempre que su actividad de unión al antígeno es más baja en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro, y tiene actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro. Las moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno antagonistas. Tal molécula de unión al antígeno antagonista es normalmente una molécula de

unión al antígeno que inhibe la señalización intracelular mediada por receptores mediante el bloqueo de la unión entre el ligando (agonista) y receptor.

Entretanto, una molécula de unión al antígeno de la presente descripción puede reconocer cualquier antígeno. En forma específica, los antígenos reconocidos mediante una molécula de unión al antígeno de la presente invención incluyen, por ejemplo, las proteínas receptoras descritas anteriormente (receptores unidos a membrana y receptores solubles), antígenos de membrana tales como marcadores de superficie celular y antígenos solubles tales como citoquinas. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, los antígenos descritos anteriormente.

En una realización preferida, las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente incluyen inmunoglobulina tipo IgGs (anticuerpos IgG) que tienen un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano. Cuando un anticuerpo IgG se usa como una molécula de unión al antígeno, el tipo no está limitado; y es posible usar IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares.

El origen de la molécula de unión al antígeno descrita en la presente no está particularmente limitada, y puede ser de cualquier origen. Es posible utilizar, por ejemplo, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de cabra, anticuerpos de camello y otros. Además, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos descritos anteriormente y, en particular, anticuerpos alterados con sustituciones de la secuencia de aminoácidos, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también pueden ser los anticuerpos biespecíficos camello y otros. Además, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos descritos, productos de modificación de anticuerpos a los que se han unido varias moléculas, polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpo y anticuerpos con cadenas de azúcar modificadas.

El anticuerpo biespecífico se refiere a un anticuerpo que tiene, en la misma molécula de anticuerpo, regiones variables que reconocen epítopos diferentes. Un anticuerpo biespecífico o multiespecífico puede ser un anticuerpo que reconoce dos o más antígenos diferentes, o un anticuerpo que reconoce dos o más epítopos diferentes sobre un mismo antígeno.

Además, los polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')2, scFvs (Nat Biotechnol., septiembre de 2005, 23 (9): 1126-36), anticuerpos de dominio (dAbs) (WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv - Fc (WO 2005/037989), dAb - Fc, y proteínas de fusión Fc. El dominio Fc se puede usar como un dominio de unión a FcRn humano cuando una molécula incluye un dominio Fc. Alternativamente, un dominio de unión a FcRn se puede fusionar a estas moléculas.

Además, las moléculas de unión al antígeno que son aplicables a la presente descripción pueden ser moléculas tipo anticuerpos. Una molécula tipo anticuerpo (molécula de armazón, molécula de péptido) es una molécula que puede exhibir funciones mediante la unión a una molécula blanco (Current Opinion in Biotechnology (2006) 17: 653 - 658) 1-10, Current Opinion in Biotechnology (2007) 18: 1-10; Current Opinion in Structural Biology (1997) 7: 463-469; Protein Science (2006) 15: 14-27), y incluye, por ejemplo, DARPins (WO 2002/020565), Affibody (WO 1995/001937), Avimer (WO 2004/044011; WO 2005/040229), y Adnectin (WO 2002/032925). Si estas moléculas similares a anticuerpos se pueden unir a moléculas blanco de una manera dependiente del pH y/o tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, es posible facilitar la captación de antígeno en las células por las moléculas de unión al antígeno, facilitar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno, mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única.

Además, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína resultante de la fusión entre un dominio de unión a FcRn humano y una proteína receptora que se une a un blanco que incluye un ligando e incluye, por ejemplo, proteínas de fusión TNFR-Fc, proteínas de fusión IL1R-Fc, proteínas de fusión VEGFR-Fc y proteínas de fusión CTLA4-Fc (Nat Med. Enero de 2003, 9 (1): 47 - 52, BioDrugs. (2006) 20 (3): 151 - 60). Si estas proteínas de fusión del dominio de unión a FcRn humano e unen a una molécula blanco que incluye un ligando de una manera dependiente del pH y/o tienen actividad de unión de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, es posible facilitar la captación de antígeno en las células por las moléculas de unión al antígeno, facilitar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno, y mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única. Una proteína receptora está adecuadamente diseñada y modificada para incluir un dominio de unión de la proteína receptora a un blanco que incluye un ligando. Como se ha hecho referencia al ejemplo anterior, que incluye proteínas de fusión TNFR-Fc, proteínas de fusión IL1R-Fc, proteínas de fusión VEGFR-Fc y proteínas de fusión CTLA4-Fc, Con preferencia se usa una molécula receptora soluble que comprende un dominio extracelular de aquellas proteínas receptoras que son necesarias para unirse a los blancos que incluyen ligandos en la presente descripción. La molécula receptora diseñada y modificada se refiere como un receptor artificial en esta solicitud. Un procedimiento empleado para diseñar y modificar una molécula receptora para construir una molécula receptora artificial es conocido en la técnica.

Además, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína de fusión en que la proteína del ligando artificial que se une a un blanco y tiene el efecto neutralizante se fusiona con un dominio de unión a FcRn humano, y una proteína del ligando artificial incluye, por ejemplo, IL-6 mutante (EMBO J. 15 de diciembre de 1994; 13(24): 5863-

70). Si tales proteínas de fusión del ligando artificial se pueden unir a moléculas blanco de una manera dependiente del pH y/o tienen actividad de unión de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro, es posible facilitar la captación de antígeno en las células por las moléculas de unión al antígeno, facilitar la reducción de la concentración de antígeno en plasma mediante la administración de las moléculas de unión al antígeno, mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única.

Además, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden incluir cadenas de azúcar modificadas. Los anticuerpos con cadenas de azúcar modificadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos con glicosilación modificada (WO 99/54342), anticuerpos que son deficientes en fucosa que se añade a la cadena de azúcar (WO 00/61739, WO 02/31140, WO 2006/067847; WO2 006/067913), y anticuerpos que tienen cadenas de azúcar con GlcNAc de bisección (WO 02/79255).

Las condiciones usadas en el ensayo para la actividad de unión al antígeno o unión a FcRn humano diferente del pH pueden ser seleccionadas apropiadamente por los expertos en la técnica, y las condiciones no están particularmente limitadas. Por ejemplo, las condiciones de uso del tampón MES a 37 grados C como se describe en el documento WO 2009/125825 se pueden usar para determinar la actividad. Entretanto, la actividad de unión al antígeno y actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare) o similares. Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de una molécula de unión al antígeno para unirse al antígeno soluble se puede determinar mediante la carga del antígeno como un analito en un chip inmovilizado con la molécula de unión al antígeno. De forma alternativa, cuando el antígeno es un antígeno tipo membrana, la actividad de la molécula de unión al antígeno para unirse al antígeno tipo membrana se puede determinar mediante la carga de la molécula de unión al antígeno como un analito en un chip con antígeno inmovilizado. La actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante la carga de FcRn humano o la molécula de unión al antígeno como un analito en un chip inmovilizado con la molécula de unión al antígeno o FcRn humano, respectivamente.

Se conoce la generación de anticuerpos quiméricos. En el caso de un anticuerpo quimérico humano-ratón, por ejemplo, un ADN que codifica una región V del anticuerpo se puede unir a un ADN que codifica una región C del anticuerpo humano; Esto se puede insertar en un vector de expresión y se introduce en un huésped para producir el anticuerpo quimérico.

Los “anticuerpos humanizados” también se denominan anticuerpos humanos reformados y son anticuerpos en los que la región determinante de complementariedad (CDR) de un mamífero no humano, por ejemplo un ratón, se trasplanta a la CDR de un anticuerpo humano. Se conocen procedimientos para identificar las CDR (Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877). También se conocen tecnologías de recombinación genética general adecuadas para este propósito (ver la solicitud de patente europea EP 125023 y WO 96/02576). Los anticuerpos humanizados se pueden producir por procedimientos conocidos, por ejemplo, se puede determinar la CDR de un anticuerpo de ratón y se obtiene un ADN que codifica un anticuerpo en el que la CDR está unida a la región estructural (FR) de un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados se pueden producir entonces usando un sistema que utiliza vectores de expresión convencionales. Tales ADN se pueden sintetizar por PCR, usando como cebadores varios oligonucleótidos preparados para tener porciones que se superponen con las regiones finales de las CDR y la FR (ver el procedimiento descrito en el documento WO 98/13388). Los anticuerpos humanos FR ligados a través de las CDR se seleccionan de manera que las CDR forman un sitio de unión al antígeno adecuado. Si es necesario, los aminoácidos en las FR de una región variable de anticuerpo se pueden alterar de manera que las CDR del anticuerpo humano reformado puedan formar un sitio de unión al antígeno adecuado (Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 10,01-6). Los residuos de aminoácidos en los FR que se pueden alterar incluyen porciones que se unen directamente a un antígeno a través de enlaces no covalentes (Amit et al., Science (1986) 233: 747-53), porciones que influyen o tienen un efecto sobre la CDR (Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17), y porciones implicadas en interacciones VH-VL (EP 239400).

Cuando las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente son anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, las regiones C de estos anticuerpos se derivan con preferencia de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se puede usar C-gamma1, C-gamma2, C-gamma3 y C-gamma4 para la cadena H, mientras que C-kappa y C-lambda se pueden usar para la cadena L. Además, si es necesario, se pueden introducir mutaciones de aminoácidos en la región C del anticuerpo humano para aumentar o disminuir la unión al receptor Fc-gamma o para mejorar la estabilidad o productividad del anticuerpo. Un anticuerpo quimérico de la presente descripción incluye con preferencia una región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Mientras tanto, un anticuerpo humanizado con preferencia incluye las CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y regiones FR y C derivadas de un anticuerpo humano. Las regiones constantes derivadas de anticuerpos humanos con preferencia incluyen una región de unión a FcRn humano. Tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Las regiones constantes usadas para los anticuerpos humanizados descritos en la presente pueden ser regiones constantes de anticuerpos de cualquier isotipo. Se usa con preferencia una región constante derivada de IgG1 humana, aunque no está limitada a la misma. Las FR derivadas de un anticuerpo humano, que se utilizan para los anticuerpos humanizados, tampoco

están particularmente limitadas, y se pueden derivar de un anticuerpo de cualquier isotipo.

Las regiones variables y constantes de anticuerpos quiméricos y humanizados descritos en la presente pueden ser alteradas por supresión, sustitución, inserción y/o adición, y similares, siempre que se muestre la especificidad de unión de los anticuerpos originales.

Debido a que se reduce la inmunogenicidad en el cuerpo humano, se piensa que los anticuerpos quiméricos y humanizados que utilizan secuencias derivadas de seres humanos son útiles cuando se administran a seres humanos con fines terapéuticos o similares.

Tales moléculas de unión al antígeno se pueden obtener por cualquier procedimiento. Por ejemplo, una molécula de unión al antígeno que originalmente no tiene actividad de unión de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácidos y neutro, una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión al antígeno mayor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro, o una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión al antígeno en los intervalos de pH ácido y neutro comparable se puede alterar artificialmente en una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad deseada a través de las alteraciones de aminoácido descritas anteriormente o similares. De forma alternativa, un anticuerpo un anticuerpo que tiene una actividad deseada se puede seleccionar mediante la detección de un número de anticuerpos obtenidos de las bibliotecas de anticuerpos o hibridomas descritos a continuación.

Al alterar los aminoácidos en una molécula de unión al antígeno, es posible utilizar una secuencia conocida para la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión al antígeno antes de la alteración o la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión al antígeno recién identificada por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, se puede obtener de bibliotecas de anticuerpos o clonar un gen que codifica un anticuerpo a partir de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

Con respecto a las bibliotecas de anticuerpos, ya se conocen muchas bibliotecas de anticuerpos, y se conocen también procedimientos para producir bibliotecas de anticuerpos; por lo tanto, los expertos en la técnica pueden obtener apropiadamente bibliotecas de anticuerpos. Por ejemplo, con respecto a bibliotecas de fagos, se puede hacer referencia a la bibliografía tal como Clackson et al., Nature (1991) 352: 624-8; Marks et al., J. Mol. Biol. (1991) 222: 581-97; Waterhouses et al., Nucleic Acids Res. (1993) 21: 2265-6; Griffiths et al., EMBO J. (1994) 13: 324,0-60; Vaughan et al., Nature Biotechnology (1996) 14: 309-14; y la Publicación de la patente japonesa Kohyo Nº (JP-A) H20-504970 (publicación en fase nacional japonesa no examinada que corresponde a una publicación internacional no japonesa). Además, es posible utilizar procedimientos conocidos, tales como procedimientos que utilizan células eucariotas como bibliotecas (WO 95/15393) y procedimientos de despliegue de ribosomas. Además, también se conocen tecnologías para obtener anticuerpos humanos por purificación usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de anticuerpos humanos se pueden expresar en la superficie de fagos como anticuerpos de cadena simple (scFvs) usando procedimientos de despliegue en fagos, y se pueden seleccionar fagos que se unen a antígenos. El análisis genético de los fagos seleccionados puede determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de anticuerpos humanos que se unen a los antígenos. Una vez que se revelan las secuencias de ADN de scFv que se unen a los antígenos, se pueden producir vectores de expresión adecuados en base a estas secuencias para obtener anticuerpos humanos. Estos procedimientos son ya bien conocidos, y se puede hacer referencia a los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

En cuanto a los procedimientos para obtener genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas, se pueden utilizar básicamente tecnologías conocidas, que implican el uso de antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados como antígenos sensibilizantes, estos se usan para realizar inmunizaciones de acuerdo con procedimientos de inmunización convencionales, que fusionan las células inmunitarias conocidas con la células progenitoras conocidas por procedimientos convencionales de fusión celular, selección de células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante procedimientos de detección convencionales, síntesis de ADN de regiones variables de anticuerpo (regiones V) a partir de ARNm de los hibridomas obtenidos usando transcriptasa inversa y unión de esta con ADN que codifican las regiones constantes del anticuerpo deseadas (regiones C)

Más específicamente, los antígenos de sensibilización para obtener los genes de moléculas de unión al antígeno descritos anteriormente que codifican las cadenas H y las cadenas L pueden incluir, por ejemplo, tanto antígenos completos con inmunogenicidad como antígenos incompletos que incluyen haptenos y similares sin inmunogenicidad; sin embargo, no se limitan a estos ejemplos. Por ejemplo, es posible utilizar proteínas completas y péptidos parciales de proteínas de interés. Además, se sabe que las sustancias que comprenden polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y tales pueden ser antígenos. Así, los antígenos de las moléculas de unión al antígeno descritos en la presente no están particularmente limitados. Los antígenos se pueden preparar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por procedimientos basados en baculovirus (por ejemplo, WO 98/46777) y similares. Los hibridomas se pueden producir, por ejemplo, mediante el procedimiento de Milstein et al. (G. Kohler y C. Milstein, Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) y similares. Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, la inmunización se puede realizar después de ligar el antígeno con una macromolécula que tiene inmunogenicidad, tal como albúmina. De forma alternativa, si es necesario, los antígenos se pueden convertir en

antígenos solubles mediante su unión con otras moléculas. Cuando se usan moléculas transmembranas tales como antígenos de membrana (por ejemplo, receptores) como antígenos, se pueden usar porciones de las regiones extracelulares de los antígenos de membrana como fragmento, o se pueden usar células que expresan moléculas transmembranas en su superficie celular como inmunógenos.

Las células productoras de moléculas de unión al antígeno se pueden obtener mediante la inmunización de animales usando antígenos sensibilizantes apropiados descritos anteriormente. Alternativamente, las células productoras de moléculas de unión al antígeno se pueden preparar mediante la inmunización in vitro de linfocitos que pueden producir moléculas de unión al antígeno. Se pueden usar varios mamíferos para la inmunización; tales animales comúnmente usados incluyen roedores, lagomorfos y primates. Tales animales incluyen, por ejemplo, roedores tales como ratones, ratas y hámsteres; lagomorfos tales como conejos; y primates que incluyen monos tales como monos cynomolgus, monos rhesus, babuinos y chimpancés. Además, también se conocen animales transgénicos que llevan repertorios de genes de anticuerpos humanos y se pueden obtener anticuerpos humanos usando estos animales (ver el documento WO 96/34096, Mendez et al., Nat. Genet. (1997) 15: 146-56). En lugar de utilizar tales animales transgénicos, por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos humanos deseados que tienen actividad de unión frente a antígenos mediante la sensibilización in vitro de linfocitos humanos con antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados y, a continuación, fusión de los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano tales como U266 (ver la publicación de la solicitud de patente japonesa Kokoku Nº (JP-B) H01-59878 (solicitud de patente japonesa examinada, aprobada publicada para oposición)). Además, se pueden obtener anticuerpos humanos deseados mediante la inmunización de animales transgénicos que llevan un repertorio completo de genes de anticuerpo humano, con los antígenos deseados (ver los documentos WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735).

La inmunización animal se puede llevar a cabo mediante la dilución y suspensión apropiada de un antígeno sensibilizante en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, o similares, y el mezclado con un adyuvante para emulsionar, si es necesario. Esto luego se inyecta por vía intraperitoneal o subcutánea en animales. A continuación, el antígeno sensibilizador mezclado con adyuvante incompleto de Freund con preferencia se administra varias veces cada cuatro a 21 días. La producción de anticuerpos se puede confirmar mediante la medición del título del anticuerpo de interés en sueros animales usando procedimientos convencionales.

Las células productoras de moléculas que se unen a antígenos obtenidas de linfocitos o animales inmunizados con un antígeno deseado se pueden fusionar con células de mieloma para generar hibridomas usando agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) (Goding, Monoclonal Anticuerpos: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 59 - 103). Cuando se requiere, las células de hibridoma se pueden cultivarse y crecer, y la especificidad de unión de la molécula de unión a antígeno producida a partir de estos hibridomas se puede medir usando procedimientos de análisis conocidos, tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima). Después de ello, si es necesario, se pueden subclonar los hibridomas que producen moléculas de interés de unión a l antígeno de interés, cuya especificidad, afinidad o actividad se ha determinado por procedimientos tales como dilución limitante.

A continuación, los genes que codifican las moléculas de unión al antígeno seleccionadas se pueden clonar a partir de hibridomas o células productoras de moléculas de unión al antígeno (linfocitos sensibilizados y similares) usando sondas que se pueden unir específicamente a las moléculas de unión al antígeno (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios a secuencias que codifican las regiones constantes del anticuerpo). También es posible clonar los genes del ARNm usando RT-PCR. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Estas clases se dividen además en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4, IgA-1 e IgA-2 y similares). Las cadenas H y L utilizadas en la presente descripción para producir moléculas de unión al antígeno no están particularmente limitadas y se pueden originar a partir de anticuerpos pertenecientes a cualquiera de estas clases o subclases; Sin embargo, se prefiere particularmente IgG.

En la presente memoria, es posible alterar los genes que codifican la cadena H y los genes que codifican la cadena L usando tecnologías de ingeniería genética. Los anticuerpos genéticamente alterados, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, que se han alterado artificialmente con el fin de disminuir la inmunogenicidad heteróloga y similares contra seres humanos, se pueden producir apropiadamente para anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen regiones variables de cadena H y cadena L de anticuerpos de mamíferos no humanos, tales como anticuerpos de ratón, y las regiones constantes de cadena H y cadena L de anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos se pueden obtener mediante la unión de un ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de ratón a un ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, inserción en un vector de expresión e introducción del vector en un huésped para producir el anticuerpo. Un anticuerpo humanizado, que también se denomina anticuerpo humano reformado, se puede sintetizar por PCR usando varios oligonucleótidos producidos de manera que tengan porciones superpuestas en los extremos de las secuencias de ADN diseñadas para unir las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano tal como un ratón. El ADN resultante se puede ligar a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano. El ADN ligado se puede insertar en un vector de expresión, y el vector se puede introducir en un huésped para producir el anticuerpo (ver EP 239400 y WO 96/02576). Las FR de anticuerpo humano que están ligadas a través de la CDR se seleccionan cuando la CDR

forma un sitio de unión al antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos en la región estructural de una región variable de anticuerpo se pueden reemplazar de manera que la CDR del anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión al antígeno apropiado (K. Sato et al., Cancer Res. (1993) 53:10,01-10,06).

Además de la humanización descrita anteriormente, los anticuerpos se pueden alterar para mejorar sus propiedades biológicas, por ejemplo, la unión al antígeno.

Tales alteraciones se pueden lograr mediante procedimientos tales como mutagénesis dirigida al sitio (ver, por ejemplo, Kunkel (1910,0) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 488), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete. En general, los anticuerpos mutantes cuyas propiedades biológicas se han mejorado muestran homología y/o similitud de secuencia de aminoácidos de 70% o mayor, con más preferencia 80% o mayor, y aun con más preferencia 90% o mayor (por ejemplo, 95% o mayor, 97%, 98%, o 99%), en comparación con la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo original. En este caso, la homología y/o similitud de secuencia se define como la relación de residuos de aminoácidos que son homólogos (mismo residuo) o similares (residuos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo basado en las propiedades generales de las cadenas laterales de aminoácidos) con los residuos del anticuerpo original, después de que el valor de homología de secuencia se ha maximizado mediante el alineamiento de secuencias y la introducción de brechas si es necesario. En general, los residuos de aminoácidos naturales se clasifican en grupos sobre la base de las características de sus cadenas laterales de la siguiente manera:

(1) hidrofóbico: alanina, isoleucina, valina, metionina y leucina;

(2) hidrofílico neutro: asparagina, glutamina, cisteína, treonina y serina;

(3) ácido: ácido aspártico y ácido glutámico;

(4) básicos: arginina, histidina y lisina;

(5) residuos que afectan la orientación de la cadena: glicina y prolina; y

(6) aromático: tirosina, triptófano y fenilalanina.

En general, un total de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR, regiones hipervariables) presentes en las regiones variables de la cadena H y de la cadena L interactúan entre sí para formar un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. También se sabe que una región variable sola es capaz de reconocer y unirse a un antígeno, aunque su afinidad es menor que la afinidad del sitio de unión entero. Por lo tanto, los genes de anticuerpo que codifican la cadena H y la cadena L de la presente invención pueden codificar fragmentos que incluyen el sitio de unión al antígeno de la cadena H y la cadena L, siempre que el polipéptido codificado por el gen retenga la actividad de unión al antígeno deseado.

Como se describió anteriormente, la región variable de la cadena pesada en general está constituida por tres CDR y cuatro FR. En una realización preferida de la presente descripción residuos de aminoácidos para "alterar" se pueden seleccionar apropiadamente de los residuos de aminoácidos, por ejemplo, en una CDR o FR. En general, las alteraciones de residuos de aminoácidos en las CDR pueden reducir la capacidad de unión al antígeno. En consecuencia, los residuos de aminoácidos apropiados para "alterar" en la presente invención con preferencia se seleccionan de los residuos de aminoácidos de las FR, pero no se limitan a estos. Es posible seleccionar aminoácidos en una CDR siempre que se haya confirmado que la alteración no reduce la capacidad de unión. Alternativamente, mediante el uso de bases de datos públicas o tales, los expertos en la técnica pueden obtener secuencias apropiadas que se pueden usar como un FR de región variable de anticuerpo de un organismo tal como humano o ratón.

Además, la presente descripción proporciona genes que codifican las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria. Los genes que codifican las moléculas de unión al antígeno de la presente invención pueden ser cualquiera de los genes, y pueden ser ADN, ARN, análogos de ácido nucleico o similares.

Además, la presente descripción también proporciona células huésped que llevan los genes descritos anteriormente. Las células huésped no están particularmente limitadas e incluyen, por ejemplo, E. coli y diversas células animales. Las células huésped se pueden usar, por ejemplo, como un sistema de producción para producir y expresar los anticuerpos descritos en la presente memoria. Existen sistemas de producción in vitro e in vivo para sistemas de producción de polipéptidos. Tales sistemas de producción in vitro incluyen, por ejemplo, sistemas de producción que utilizan células eucariotas o células procariotas.

Las células eucariotas que se pueden usar como células huésped incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen: células de mamífero, por ejemplo CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 94,0), COS, HEK293, 3T3, mieloma, BHK (riñón de hámster de bebé), HeLa y Vero; células de anfibios tales como oocitos de Xenopus laevis (Valle et al., Nature (1981) 291: 338 - 340); y células de insecto tales como Sf9, Sf21 y Tn5. CHO-DG44, CHO-DX11B, células COS7, células HEK293 y células BHK se utilizan con preferencia para expresar los anticuerpos descritos en la presente memoria. Entre las células animales, las células las CHO son

particularmente preferibles para la expresión a gran escala. Los vectores se pueden introducir en células huésped, por ejemplo, mediante procedimientos de fosfato de calcio, procedimientos DEAE-dextrano, procedimientos que utilizan liposomas catiónicos DOTAP (Boehringer-Mannheim), procedimientos de electroporación y procedimientos de lipofección.

Con respecto a las células vegetales, por ejemplo, las células derivadas de Nicotiana tabacum y la lenteja de agua (Lemna minor) se conocen como un sistema de producción de proteínas. Los callos se pueden cultivar a partir de estas células para producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria. Con respecto a las células fúngicas, los sistemas de expresión de proteínas conocidos son los que utilizan células de levadura, por ejemplo, células del género Saccharomyces (tales como Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces pombe); y células de hongos filamentosos, por ejemplo, el género Aspergillus (tales como Aspergillus niger). Estas células se pueden usar como un huésped para producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria.

Las células bacterianas se pueden usar en los sistemas de producción procarióticos. Con respecto a las células bacterianas, se conocen sistemas de producción que utilizan Bacillus subtilis además de los sistemas de producción que usan E. coli descritos anteriormente. Tales sistemas se pueden usar en la producción de las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria.

<Procedimiento de detección>

La presente descripción proporciona procedimientos de detección para las moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro y una actividad de unión al antígeno menor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro. La presente descripción también proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno capaces de facilitar la captación de antígeno en las células. La presente descripción también proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno modificador para ser capaces de unir a más antígenos por molécula. La presente descripción también proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno capaces de facilitar la eliminación de antígeno. La presente descripción además proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno con una farmacocinética mejorada. La presente descripción también proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno con disociación intracelular facilitada de su antígeno unido fuera de las células. La presente descripción también proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno con liberación extracelular facilitada en una forma libre de antígeno después de la captación en las células en una forma unida a antígeno. La presente descripción además proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno que son particularmente útiles como composiciones farmacéuticas. Los procedimientos descritos anteriormente son útiles para la detección de las moléculas de unión al antígeno que son particularmente superiores en plasma retención y tienen superior capacidad para eliminar antígenos del plasma.

En forma específica, la presente invención proporciona procedimientos de detección para moléculas de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido; y

(b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno y seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno más fuerte en el intervalo de pH neutro que en el intervalo de pH ácido.

Las etapas (a) y (b) se puede llevar a cabo en cualquier orden. Además, cada etapa se puede repetir dos veces o más veces. El número de veces de repetición de las etapas (a) y (b) no está particularmente limitado; sin embargo, el número es normalmente diez veces o menos.

En los procedimientos de detección descritos en la presente memoria, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitada, siempre que sea una actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH 6,7 a 10,0. Por ejemplo, se incluyen las realizaciones descritas en el documento WO 2009/125825. Las actividades de unión al antígeno preferidas incluyen actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH 7,0 a 8,0. Las actividades de unión al antígeno más preferidas incluyen actividad de unión al antígeno a pH 7,4. Entretanto, la actividad de unión al antígeno de molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido no está particularmente limitada, siempre que sea una actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH 4,0 a 6,5. Las actividades de unión al antígeno preferidas incluyen actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH 5,5 y 6,5. Las actividades de unión al antígeno más preferidas incluyen actividad de unión al antígeno a pH 5,8 o pH 5,5.

La actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitada, siempre que sea una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 6,7 a 10,0.

Las actividades de unión al FcRn humano preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 7,0 a 8,0. Las actividades de unión al FcRn humano más preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano a pH 7,4.

La actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido no está particularmente limitada, siempre que sea una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 4,0 a 6,5. Las actividades de unión al FcRn humano preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 5,5 a 6,5. Las actividades de unión al FcRn humano más preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 5,8 a 6,0.

En la presente memoria, el intervalo de pH ácido normalmente se refiere a pH 4,0 a pH 6,5. El intervalo de pH ácido con preferencia es un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 5,5 a pH 6,5, con preferencia seleccionado de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, o 6,5, con particular preferencia pH 5,8 a pH 6,0, que es cercano al pH en el endosoma temprano in vivo. Entretanto, en la presente el intervalo de pH neutro normalmente se refiere a pH 6,7 a pH 10,0. El intervalo de pH neutro con preferencia es un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 7,0 a pH 8,0, con preferencia seleccionado de pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, y 8,0, con particular preferencia pH 7,4, que es cercano a pH plasmático in vivo (sangre). El pH 7,0 se puede usar como una alternativa a pH 7,4 cuando es difícil de evaluar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano debido a su baja afinidad a pH 7,4. Como una temperatura empleada en la condición de ensayo, una afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano se puede evaluar a cualquier temperatura de 10 grados C a 50 grados C. Con preferencia, se emplea una temperatura de 15 grados C a 40 grados C a fin de determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Con más preferencia, también se emplea cualquier temperatura de 20 grados C a 35 grados C, como cualquiera de 20, 21, 22, 23, 24, 45, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, y 35 grados C a fin de determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Una temperatura a 25 grados C descrito en el Ejemplo 5 es una del Ejemplo para la realización de esta descripción.

La actividad de unión al antígeno y actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Las condiciones apropiadas además de pH pueden ser seleccionadas por los expertos en la técnica. La actividad de unión al antígeno y actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno se puede evaluar mediante el uso de KD (constante de disociación), KD aparente (constante de disociación aparente), velocidad de disociación k_d (velocidad de disociación), KD aparente (disociación aparente: velocidad de disociación aparente), o similares. Se pueden determinar mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare), diagrama de Scatchard, citómetro de flujo, o similares.

De acuerdo con el Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671, la actividad de unión a FcRn humano de IgG1 humana intacta es KD 1,7 micromolar en el intervalo de pH ácido (pH 6,0), mientras que la actividad es casi indetectable en el intervalo de pH neutro. En consecuencia, en una realización preferida, se pueden detectar las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que tiene actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro que incluyen las moléculas de unión al antígeno que tienen una actividad de unión a FcRn humano de KD 20 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido, que es igual a o más fuerte que la de la IgG humana intacta en el intervalo de pH neutro. En una realización más preferida, se pueden detectar las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que incluyen las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 2,0 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido y KD 40 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. En una realización aún más preferida, se pueden detectar las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 0,5 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido y KD 15 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. Los anteriores valores de KD se determinan mediante el procedimiento descrito en el Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (mediante la inmovilización de la molécula de unión al antígeno en un chip y cargar FcRn humano como un analito).

La presente descripción proporciona un procedimiento de detección de una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que KD 3,2 micromolar obtenida mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno,

(b) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en el que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparados en (a) están ligados; y

(c) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (b).

En una realización, se puede detectar una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro, donde una actividad de unión al FcRn humano y al antígeno menor en el intervalo de pH ácido

que en el intervalo de pH neutro es mayor que KD 3,2 micromolar de acuerdo con los procedimientos empleados por los expertos en la técnica como se describió antes en la presente memoria. En una realización más preferida, actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 grados C es mayor que KD 3,2 micromolar.

La presente descripción proporciona un procedimiento de detección de una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro, donde una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro es mayor que KD 2,3 micromolar. La presente descripción también proporciona un procedimiento para la detección de una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro, donde una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro es 38 veces mayor que una IgG humana intacta.

Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitados, siempre que tengan una actividad de unión a FcRn humano a pH 6,7 a 10,0. Sin embargo, la actividad de unión a FcRn humano a pH 6,7 a 10,0 de las moléculas de unión al antígeno preferidas es mayor que la de la IgG humana intacta.

Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que tiene una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido no está particularmente limitados, siempre que tengan actividad de unión de unión a FcRn humano a pH 4,0 a 6,5. Sin embargo, la actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5 a 6,5 de las moléculas de unión al antígeno preferidas es comparable con o más fuerte que la de la IgG humana intacta.

En la presente memoria, la etapa de selección de una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno mayor en el intervalo de pH neutro que en el intervalo de pH ácido es sinónimo de la etapa de selección de una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno menor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro.

La relación de actividad de unión al antígeno entre los intervalos de pH neutro y ácido no está particularmente limitada siempre que la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro sea mayor que en el intervalo de pH ácido. Sin embargo, la actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a 10,0 con preferencia es dos veces o más veces, con más preferencia diez o más veces, y aún con más preferencia 40 o más veces la actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a 6,5.

En los procedimientos de detección descritos en la presente memoria, es posible usar bibliotecas tales como bibliotecas de fago.

En los procedimientos descritos en la presente memoria, el antígeno y la molécula de unión al antígeno se pueden unir entre sí en cualquier estado, y en consecuencia el estado no está particularmente limitado. Por ejemplo, el antígeno se puede poner en contacto con una molécula de unión al antígeno inmovilizada para obtener su unión. De forma alternativa, la molécula de unión al antígeno se puede poner en contacto con un antígeno inmovilizado para obtener su unión. De forma alternativa, la molécula de unión al antígeno y el antígeno se pueden poner en contacto entre sí en una solución para obtener su unión.

Las moléculas de unión al antígeno a ser detectadas mediante los procedimientos de detección descritos en la presente se pueden preparar por cualquier procedimiento. Por ejemplo, es posible utilizar anticuerpos preexistentes, bibliotecas preexistentes de dominio de unión al antígeno (bibliotecas de fagos, etc.), bibliotecas de anticuerpos o dominio de unión a antígenos preparadas a partir de células B de animales inmunizados o hibridomas preparados mediante inmunización de animales, bibliotecas de anticuerpos o dominio de unión a antígenos obtenidas mediante la introducción de alteraciones aleatorias de aminoácidos en las bibliotecas de anticuerpos o dominios de unión a antígenos anteriormente descritos, bibliotecas de anticuerpos o dominio de unión a antígenos introducidas con mutaciones de histidina o mutaciones de aminoácidos no naturales (bibliotecas con alto contenido de histidina o aminoácido no natural, bibliotecas de dominio de unión al antígeno introducidas con mutaciones de histidina o aminoácidos no naturales en sitios específicos, etc.), o similares.

Las moléculas de unión al antígeno que se unen al antígeno múltiples veces, que son por lo tanto superiores en la retención plasmática, se pueden obtener por los procedimientos de detección de la presente invención. Por lo tanto, los procedimientos de detección descritos en la presente se pueden usar como procedimientos de detección para obtener moléculas de unión a antígenos que son superiores en la retención plasmática.

Además, las moléculas de unión al antígeno que pueden unirse al antígeno dos o más veces cuando se administran a animales tales como seres humanos, ratones o monos se pueden obtener mediante los procedimientos de detección descritos en la presente memoria. Por lo tanto, los procedimientos de detección de la presente descripción se pueden usar como procedimientos de detección para obtener moléculas de unión al antígeno que pueden unirse al antígeno dos o más veces.

Además, las moléculas de unión al antígeno que son capaces de unirse a más antígenos en comparación con el número de sus sitios de unión al antígeno cuando se administran a animales tales como seres humanos, ratones o mono se pueden obtener por los procedimientos de detección descritos en la presente memoria. En consecuencia,

los procedimientos de detección descritos en la presente se pueden usar como procedimientos de detección para obtener las moléculas de unión al antígeno que son capaces de unirse a más antígenos en comparación con el número de sus sitios de unión al antígeno. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante, los procedimientos de detección descritos en la presente se pueden usar como procedimientos de detección para obtener moléculas de unión al antígeno que pueden neutralizar más antígenos en comparación con el número de los sitios de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno.

Además, las moléculas de unión al antígeno que son capaces de disociarse dentro de una célula de un antígeno unido extracelularmente cuando se administran a animales tales como seres humanos, ratones o monos se pueden obtener por los procedimientos de detección descritos en la presente memoria.

En consecuencia, los procedimientos de detección descritos en la presente se pueden usar como procedimientos de detección para obtener moléculas de unión al antígeno que son capaces de disociarse dentro de una célula de un antígeno unido extracelularmente.

Además, las moléculas de unión al antígeno que se unen a un antígeno y son captadas por una célula, y liberadas al exterior de la célula en una forma libre de antígeno cuando se administra a animales tales como seres humanos, monos, o monos se pueden obtener mediante los procedimientos de detección descritos en la presente memoria. En consecuencia, los procedimientos de detección de la presente descripción se pueden usar como procedimientos de detección para obtener moléculas de unión al antígeno que se unen a un antígeno y son captadas por una célula, y liberadas al exterior de la célula de una forma libre de antígeno.

Además, las moléculas de unión al antígeno que pueden eliminar rápidamente antígenos en plasma cuando se administran a animales tales como seres humanos, ratones o monos se pueden obtener mediante los procedimientos de detección de la presente invención. Por lo tanto, los procedimientos de detección descritos en la presente se pueden usar como procedimientos de detección para obtener moléculas de unión al antígeno con capacidad aumentada (alta) para eliminar antígenos en plasma,

Además, se espera que tales moléculas de unión al antígeno sean especialmente superiores como productos farmacéuticos, ya que la dosis y la frecuencia de administración en pacientes se pueden reducir y, como resultado, se puede reducir la dosis total. Por lo tanto, los procedimientos de detección descritos en la presente se pueden usar como procedimientos de detección de moléculas de unión a antígeno para uso como composiciones farmacéuticas.

<Procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno>

La presente descripción proporciona procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión de unión a FcRn humano en el pH endosómico y pH plasmático y actividad de unión al antígeno menor en el pH endosómico que en el pH plasmático. La presente descripción también proporciona procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno que son superiores en la farmacocinética y en la facilitación de la reducción de la concentración de antígeno en plasma cuando se administra. La presente descripción también proporciona procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno que son particularmente útiles cuando se usan como composiciones farmacéuticas.

En forma específica, la presente descripción proporciona procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido;

(b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno y seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión al antígeno mayor en el intervalo de pH neutro que en el intervalo de pH ácido;

(c) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en que el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno preparados en (a) y (b) están ligados; y

(d) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (c).

Las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo en cualquier orden. Además, cada etapa se puede repetir dos veces o más veces. El número de veces de repetición de las etapas (a) y (b) no está particularmente limitado; sin embargo, el número es normalmente diez veces o menos.

Un enlazador liga operativamente el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno preparados en (a) y (b) no está limitado de ninguna forma. El dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno pueden estar ligados por fuerzas covalentes o no covalentes. En particular, el enlazador puede ser un enlazador peptídico o un enlazador químico o un par de unión como una combinación de biotina y estreptavidina. La

modificación de un polipéptido que incluye el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno es conocido en la técnica. En otra realización, el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión a antígeno de la presente invención se pueden unir formando una proteína de fusión entre el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno. Con el fin de construir la proteína de fusión entre el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno, los genes que codifican el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno pueden estar ligados operativamente para formar el polipéptido de fusión en marco. De forma apropiada, se puede insertar un enlazador que comprende péptido que consiste en varios aminoácidos entre el dominio de unión a FcRn humano y el dominio de unión al antígeno. Varios enlazadores flexibles como el enlazador cuya secuencia consiste en (GGGGS) que se conocen en la técnica.

Las moléculas de unión al antígeno que se usan en los procedimientos de producción descritos en la presente se pueden preparar por cualquier procedimiento. Por ejemplo, es posible utilizar anticuerpos preexistentes, bibliotecas preexistentes (bibliotecas de fagos y similares), anticuerpos y bibliotecas que se preparan a partir de hibridomas obtenidos mediante inmunización de animales o de células B de animales inmunizados, anticuerpos y bibliotecas preparados mediante la introducción de alteraciones de aminoácidos aleatorias en los anticuerpos y bibliotecas descritos anteriormente, anticuerpos y librerías preparados mediante la introducción de mutaciones de histidina o aminoácidos no naturales en los anticuerpos y bibliotecas descritos anteriormente (bibliotecas con alto contenido de histidina o aminoácido no natural, bibliotecas introducidas con histidina o aminoácidos no naturales en sitios específicos, y similares), y similares.

En los procedimientos de producción descritos anteriormente, la actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitada siempre que sea una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 6,7 a 10,0. Las actividades de unión al FcRn humano preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 7,0 a 8,0. Las actividades de unión al FcRn humano más preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano a pH 7,4.

La actividad de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido no está particularmente limitada, siempre que sea una actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 4,0 a 6,5. Las actividades de unión al FcRn humano preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH 5,5 a 6,5. Las actividades de unión al FcRn humano más preferidas incluyen actividad de unión a FcRn humano a pH 6,0.

En la presente memoria, el intervalo de pH ácido normalmente se refiere a pH 4,0 a pH 6,5. El intervalo de pH ácido con preferencia es un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 5,5 a pH 6,5, con preferencia seleccionado de 5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5, 9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, y 6,5, con particular preferencia pH 5,8 a pH 6,0, que es cercano al pH en el endosoma temprano in vivo. Entretanto, en la presente el intervalo de pH neutro normalmente se refiere a pH 6,7 a pH 10,0. El intervalo de pH neutro con preferencia es un intervalo indicado por cualquier valor de pH dentro del pH 7,0 a pH 8,0, con preferencia seleccionado de pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, y 8,0, con particular preferencia pH 7,4, que es cercano al pH plasmático in vivo (sangre). El pH 7,0 se puede usar como una alternativa al pH 7,4 cuando es difícil evaluar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano debido a su baja afinidad a pH 7,4. Como una temperatura empleada en la condición de ensayo, una afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano se puede evaluar a cualquier temperatura de 10 grados C a 50 grados C. Con preferencia, se emplea una temperatura de 15 grados C a 40 grados C a fin de determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Con más preferencia, también se emplea cualquier temperatura de 20 grados C a 35 grados C, como cualquiera de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, y 35 grados C a fin de determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcRn humano y el FcRn humano. Una temperatura a 25 grados C descrita en el Ejemplo 5 es una del ejemplo para la realización de esta invención.

La presente descripción proporciona un procedimiento para producir una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte en el intervalo de pH neutro que KD 3,2 micromolar obtenida mediante la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano de una molécula de unión al antígeno;

(b) obtener un gen que codifica una molécula de unión al antígeno en el que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparados en (a) están ligados; y

(c) producir una molécula de unión al antígeno usando el gen preparado en (b).

En una realización preferida, se pueden producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que tiene actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro que incluye moléculas de unión al antígeno que tienen una actividad de unión a FcRn humano de KD 20 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido, que es igual a o más fuerte que la de la IgG humana intacta en el intervalo de pH neutro. En una realización más preferida, también se pueden producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 2,0 micromolar o más fuerte en el

intervalo de pH ácido y KD 40 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. En una realización aún más preferida, con preferencia se pueden producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente que incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcRn humano es KD 0,5 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH ácido y KD 15 micromolar o más fuerte en el intervalo de pH neutro. Los valores de KD anteriores se determinan mediante el procedimiento descrito en el Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671 (mediante la inmovilización de la molécula de unión al antígeno en un chip y la carga de FcRn humano como un analito). En una realización, se puede producir una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH ácido y neutro, donde una actividad de unión al FcRn humano y al antígeno menor en el intervalo de pH ácido que en el intervalo de pH neutro es mayor que KD 3,2 micromolar de acuerdo con los procedimientos empleados por los expertos en la técnica como se describió antes en la presente memoria. En una realización más preferida, actividad de unión a FcRn humano de la molécula de unión al antígeno producida de este modo a pH 7,0 y 25 grados C es mayor que KD 3,2 micromolar.

La presente descripción proporciona un procedimiento para producir una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro, donde una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro es mayor que KD 2,3 micromolar. La presente descripción también proporciona un procedimiento para producir una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro, donde una actividad de unión a FcRn humano en los intervalos de pH neutro es 38 veces mayor que una IgG humana intacta.

En los procedimientos de producción descritos anteriormente, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitada, siempre que la actividad de unión al antígeno sea la de un pH entre pH 6,7 y pH 10,0, e incluye, por ejemplo, una realización descrita en el documento WO 2009/125825. Una actividad de unión al antígeno preferida es la que se obtiene a un pH entre pH 7,0 y pH 8,0, y una actividad de unión al antígeno más preferida es la que se obtiene a un pH 7,4. De forma alternativa, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido no está particularmente limitada, siempre que la actividad de unión al antígeno sea la que se obtiene a un pH entre pH 4,0 y pH 6,5. Una actividad de unión al antígeno preferida es la que se obtiene a un pH entre pH 5,5 a pH 6,5, y una actividad de unión al antígeno más preferida es la que se obtiene a un pH 5,8 o pH 5,5.

La actividad de unión al antígeno y actividad de unión de FcRn humano de una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Las condiciones excepto para el pH pueden ser determinadas propiamente por los expertos en la técnica.

En los procedimientos de producción descritos en la presente memoria, moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro no está particularmente limitados siempre que tengan actividad de unión de unión a FcRn humano a pH 6,7 a 10,0. Sin embargo, la actividad de unión a FcRn humano de las moléculas de unión al antígeno a pH 6,7 a 10,0 con preferencia es más fuerte que la de la IgG humana intacta. Con más preferencia, las moléculas de unión al antígeno tienen una actividad de unión a FcRn humano más fuerte que una KD 40 micromolar, aún con más preferencia más fuerte que la KD 15 micromolar.

En los procedimientos de producción descritos en la presente memoria, las moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH ácido no están particularmente limitadas siempre que tengan actividad de unión de unión a FcRn humano a pH 4,0 a 6,5. Sin embargo, a pH 5,5 a 6,5, las moléculas de unión al antígeno con preferencia tienen una actividad de unión a FcRn humano más fuerte que la KD 20 micromolar. La actividad de unión a FcRn humano con más preferencia comparable a o más fuerte que la de la IgG1 humana intacta (más fuerte que KD 1,7 micromolar), con más preferencia más fuerte que la KD 0,5 micromolar.

Los valores de KD descritos anteriormente se determinan mediante el procedimiento descrito en "The Journal of Immunology, (2009) 182: 7663-7671" (mediante la inmovilización de la molécula de unión al antígeno en un chip y la carga de FcRn humano como un analito).

En los procedimientos de producción descritos en la presente memoria, la etapa de selección de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 es mayor que a pH 4,0 a pH 6,5 es sinónimo de la etapa de selección de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 es menor que a pH 6,7 a pH 10,0.

La relación entre la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro y en el intervalo de pH ácido no está particularmente limitada siempre que la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro sea mayor que en el intervalo de pH ácido. La actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 con preferencia es dos veces o más fuerte, con más preferencia diez veces o más fuerte, y aún con más preferencia 40 veces o más fuerte que la obtenida a un pH 4,0 a pH 6,5.

En los procedimientos de producción descritos anteriormente, el antígeno y molécula de unión al antígeno se pueden unir entre sí en cualquier estado, y el FcRn humano y la molécula de unión al antígeno se pueden unir entre

sí en cualquier estado. El estado no está particularmente limitado; por ejemplo, el antígeno o FcRn humano se pueden poner en contacto una molécula de unión al antígeno inmovilizada para unirse a la molécula de unión al antígeno. De forma alternativa, la molécula de unión al antígeno se puede poner en contacto con un antígeno o FcRn humano inmovilizado para unir la molécula de unión al antígeno. De forma alternativa, la molécula de unión al antígeno se puede poner en contacto con el antígeno o FcRn humano en una solución para unir la molécula de unión al antígeno.

Las moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos descritos anteriormente pueden ser cualquier molécula de unión al antígeno; y las moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen, por ejemplo, las que tienen un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que contiene la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano, y la sustitución de los aminoácidos por histidina o inserción de al menos una histidina.

Las alteraciones de aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano no están particularmente limitadas, siempre que aumenten la actividad de unión a FcRn humano en el intervalo de pH neutro. Las alteraciones incluyen, por ejemplo, las de los aminoácidos de las posiciones 221 a 225, 227, 228, 230, 232, 233 a 241, 243 a 252, 254 a 260, 262 a 272, 274, 276, 278 8 a 289, 291 a 312, 315 a 320, 324, 325, 327 a 339, 341, 343, 345, 360, 362, 370, 375 a 378, 380, 382, 385 a 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 a 438, 440, y 442 (numeración EU) en el dominio Fc de IgG descrito anteriormente. Más específicamente, las alteraciones de aminoácido incluyen las de las posiciones de aminoácidos mostradas en las Tablas 1, 2, 6-1, y 6-2 (en la numeración EU). Con preferencia, la actividad de unión a FcRn humano se puede aumentar en el intervalo de pH neutro mediante la alteración de al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257,258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434,y 436 (numeración EU). El número de aminoácidos para alterar no está particularmente limitado; y es posible alterar aminoácidos en solo un sitio único o dos o más sitios. Las combinaciones de dos o más alteraciones de aminoácido incluyen, por ejemplo, las mostradas en las Tablas 3, 4-1 a 4-5, 6-1, y 6-2.

Entretanto, el sitio en que se introduce la mutación de histidina no está particularmente limitado, y en consecuencia se puede introducir en cualquier posición siempre que la mutación de histidina reduzca la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido a menos que en el intervalo de pH neutro. Tales mutaciones de histidina se pueden introducir en un sitio único o dos o más sitios.

Por lo tanto, los procedimientos de producción descritos en la presente pueden comprender además las etapas de alterar los aminoácidos descritos anteriormente y situar por sustución o insertar histidina. En los procedimientos de producción descritos en la presente se pueden usar aminoácidos no naturales en lugar de histidina. Por lo tanto, la presente descripción también se puede entender mediante el reemplazo de la histidina anteriormente mencionada con aminoácidos no naturales.

Además, en otra realización, las moléculas de unión al antígeno que son producidas por los procedimientos de producción descritos anteriormente incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno que comprenden regiones constantes del anticuerpo alteradas. Por consiguiente, los procedimientos de producción descritos en la presente también pueden comprender la etapa de alteración de los aminoácidos de las regiones constantes del anticuerpo.

Las moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos de producción descritos en la presente se administran para facilitar la reducción de la concentración de antígeno en plasma.

En consecuencia, los procedimientos de producción de la presente descripción se pueden usar como un procedimiento para producir moléculas de unión al antígeno para facilitar la reducción de la concentración de antígeno en plasma cuando se administran.

De forma alternativa, las moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos de producción descritos en la presente tienen mejor farmacocinética. En consecuencia, los procedimientos de producción de la presente descripción se pueden usar como un procedimiento para producir moléculas de unión al antígeno con una farmacocinética mejorada.

De forma alternativa, las moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos de producción descritos en la presente pueden aumentar el número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única cuando se administra a animales tales como seres humanos, ratones, y monos. En consecuencia, los procedimientos de producción de la presente descripción se pueden usar como un procedimiento para producir moléculas de unión al antígeno que tiene un aumento del número de antígenos a los que se puede unir una molécula de unión al antígeno única.

Además, se espera que las moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos de producción descritos en la presente sean capaces de disociarse dentro de una célula de un antígeno unido de forma extracelular cuando se administra a animales tales como seres humanos, ratones, o monos. En consecuencia, los procedimientos de producción de la presente descripción se pueden usar como procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno sean capaces de disociarse dentro de una célula de un antígeno unido de forma extracelular.

Además, se espera que las moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos de producción descritos en la presente sean capaces de unirse a un antígeno unido y ser captadas por una célula así como liberarse al exterior de la célula en una forma libre de antígeno, cuando se administra a animales tales como seres humanos, ratones, o monos. En consecuencia, los procedimientos de producción de la presente descripción se pueden usar como procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno que sean capaces de unirse a un antígeno unido y ser captadas por una célula así como liberarse al exterior de la célula en una forma libre de antígeno.

Además, debido a que tales moléculas de unión al antígeno tienen mayor actividad para reducir la concentración de antígeno en plasma mediante la administración en comparación con moléculas de unión al antígeno típicas, se espera que sean especialmente superiores como agentes farmacéuticos. En consecuencia, los procedimientos de producción descritos en la presente se pueden usar como procedimientos para producir moléculas de unión al antígeno para usar como composiciones farmacéuticas.

Los genes obtenidos por los procedimientos de producción descritos en la presente se llevan típicamente (insertados en) vectores apropiados, y luego se introducen en células huésped. Los vectores no están particularmente limitados siempre que retengan de forma estable los ácidos nucleicos insertados. Por ejemplo, cuando E. coli se utiliza como huésped, los vectores de clonación preferidos incluyen el vector pBluescript (Stratagene); sin embargo, se pueden usar varios vectores comercialmente disponibles. Cuando se usan vectores para producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria, los vectores de expresión son particularmente útiles. Los vectores de expresión no están particularmente limitados siempre que los vectores expresen las moléculas de unión al antígeno in vitro, en E. coli, en células de cultivo, o en un cuerpo de un organismo. Por ejemplo, se prefiere el vector pBEST (Promega) para la expresión in vitro; se prefiere el vector pET (Invitrogen) para E. coli; se prefiere el vector pME18S-FL3 (número de acceso GenBank AB009864) para células de cultivo; y se prefiere el vector pME18S (Mol Cell Biol. (1988) 8: 466-472) para cuerpos de organismos. Los ADN descritos en la presente invención se pueden insertar en los vectores mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante ligación usando sitios de enzimas de restricción (Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., (1987) Publish, John Wiley & Sons, Section 11,4-11,11).

Las células huésped anteriores no están particularmente limitadas, y se pueden usar varias células huésped de acuerdo con el propósito. Los ejemplos de células para expresar las moléculas de unión al antígeno incluyen células bacterianas (tales como las de Streptococcus, Staphylococcus, E. coli, Streptomyces y Bacillus subtilis), células eucariotas (tales como las de levadura y Aspergillus), células de insecto (tales como Drosophila S2 y Spodoptera SF9), células animales (tales como células CHO, COS, HeLa, C127,3T3, BHK, HEK293 y melanoma Bowes) y células vegetales. Los vectores se pueden introducir en una célula huésped por procedimientos conocidos, por ejemplo, procedimientos de precipitación con fosfato de calcio, procedimientos de electroporación (Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., 1987), John Wiley & Sons, Sección 9,1-9,9), procedimientos de lipofección y procedimientos de microinyección.

Las células huésped se pueden cultivar por procedimientos conocidos. Por ejemplo, cuando se usan células animales como huésped, se pueden utilizar DMEM, MEM, RPMI1640 o IMDM como medio de cultivo. Se pueden usar con suplementos de suero tales como FBS o suero fetal de ternera (FCS). Las células se pueden cultivar en cultivos libres de suero. El pH preferido es de aproximadamente 6 a 8 durante el transcurso del cultivo. La incubación se lleva a cabo típicamente a 30 a 40 grados C durante aproximadamente 15 a 200 horas. El medio es intercambiado, aireado o agitado, según sea necesario.

Se pueden incorporar señales de secreción apropiadas a polipéptidos de interés de modo que las moléculas de unión al antígeno expresadas en la célula huésped sean secretadas en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el ambiente extracelular. Estas señales pueden ser endógenas a las moléculas de unión al antígeno de interés o pueden ser señales heterólogas.

Por otra parte, por ejemplo, se pueden usar sistemas de producción que utilizan animales o plantas como sistemas para producir polipéptidos in vivo. Se introduce un polinucleótido de interés en un animal o planta y el polipéptido se produce en el cuerpo del animal o planta, y luego se recolecta. Los “huéspedes” de la presente invención incluyen tales animales y plantas.

El sistema de producción que utiliza animales incluye los que usan mamíferos o insectos. Es posible utilizar mamíferos tales como cabras, cerdos, ovejas, ratones y bovinos (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Los mamíferos pueden ser animales transgénicos.

Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno de la presente descripción se prepara como un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido producido específicamente en leche, tal como la beta-caseína de cabra. A continuación, se inyectan embriones de cabra con fragmentos polinucleotídicos que contienen el gen de fusión, y luego se trasplantan a cabras hembra. Las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden obtener a partir de la leche producida por las cabras transgénicas, que nacen de las cabras que recibieron los embriones o de su descendencia. Las hormonas se pueden administrar según sea apropiado para aumentar el volumen de leche que contiene la molécula de unión al antígeno producida por las cabras transgénicas (Ebert et al.,

Bio/Technology (1994) 12: 699 - 702).

Se pueden usar insectos tales como gusanos de seda para producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria. Cuando se utilizan gusanos de seda, se pueden usar baculovirus que portan un polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno de interés para infectar gusanos de seda, y la molécula de unión al antígeno de interés se puede obtener a partir de sus fluidos corporales.

Además, cuando se usan plantas para producir las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria, por ejemplo, se puede usar tabaco. Cuando se utiliza tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno de interés en un vector de expresión vegetal, por ejemplo, pMON 530, y luego se introduce el vector en bacterias, tales como Agrobacterium tumefaciens. Las bacterias luego se dejan infectar el tabaco tal como Nicotiana tabacum, y las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden recolectar de sus hojas (Ma et al., Eur. J. Immunol., (1994) 24: 131-138). Alternativamente, es posible infectar la lenteja de agua (Lemna minor) con bacterias similares. Después de la clonación, las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden obtener a partir de las células de lenteja de agua (Cox KM et al., Nat. Biotechnol., 24 de diciembre de 2006 (12): 1591-1597).

Las moléculas de unión al antígeno así obtenidas se pueden aislar del interior o exterior (tal como el medio y la leche) de células huésped, y purificar como moléculas de unión a antígeno sustancialmente puras y homogéneas. Los procedimientos para aislar y purificar moléculas de unión al antígeno no están particularmente limitados, y se pueden usar procedimientos de aislamiento y purificación usualmente usados para la purificación de polipéptidos. Las moléculas de unión al antígeno se pueden aislar y purificar mediante la selección y combinación apropiada, por ejemplo, por columnas cromatográficas, filtración, ultrafiltración, eliminación de sales, precipitación con solvente, extracción con solvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, Isoelectroenfoque, diálisis, y recristalización.

La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbia, filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Dichos procedimientos cromatográficos se pueden realizar usando cromatografía en fase líquida tal como HPLC y FPLC. Las columnas utilizadas para la cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Las columnas que usan la proteína A incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Pharmacia).

Si es necesario, una molécula de unión al antígeno se puede modificar arbitrariamente y los péptidos se pueden suprimir parcialmente al permitir que una enzima de modificación de proteína apropiada actúe antes o después de la purificación de la molécula de unión al antígeno. Tales enzimas de modificación de proteínas incluyen, por ejemplo, tripsina, quimotripsina, lisil endopeptidasas, proteína quinasas y glucosidasas.

<Composiciones farmacéuticas>

La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen moléculas de unión al antígeno de la presente invención, moléculas de unión al antígeno aisladas por los procedimientos de detección de la presente invención, o moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos de producción de la presente invención. Las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente y moléculas de unión al antígeno producida por los procedimientos de producción descritos en la presente tienen mayor actividad para reducir la concentración de antígeno en plasma mediante la administración en comparación con las típicas moléculas de unión al antígeno, y en consecuencia son útiles como composiciones farmacéuticas. La composición farmacéutica descrita en la presente puede incluir vehículos aceptables para uso farmacéutico.

En la presente descripción, las composiciones farmacéuticas se refieren normalmente a agentes para tratar o prevenir, o para probar y diagnosticar enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden formular por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse por vía parenteral, en forma de inyecciones de soluciones o suspensiones estériles que incluyen agua u otro líquido aceptable para uso farmacéutico. Por ejemplo, tales composiciones se pueden formular mediante la mezcla en forma de dosis unitaria requerida en la práctica de fabricación de medicamentos generalmente aprobados mediante la combinación apropiada con vehículos o medios aceptables para uso farmacéutico, específicamente con agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, suspensión, tensioactivo, estabilizante, agente aromatizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similares. En tales formulaciones, la cantidad de ingrediente activo se ajusta para obtener una cantidad apropiada en un intervalo predeterminado.

Las composiciones estériles para inyección se pueden formular usando vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con la práctica de formulación estándar. Las soluciones acuosas para inyección incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen dextrosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). También es posible utilizar en combinación solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares),

tensioactivos no iónicos (polisorbato 80 (TM), HCO-50, y similares).

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

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se administran con preferencia por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden estar en la forma de dosis para inyecciones, administración transnasal, administración transpulmonar o administración transdérmica. Por ejemplo, se pueden administrar en forma sistémica o local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o similares.

Los procedimientos de administración se pueden seleccionar apropiadamente en consideración de la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene una molécula de unión al antígeno puede ser, por ejemplo, de 0,0001 a 1,000 mg/kg para cada administración. Alternativamente, la dosis puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100,000 mg por paciente. Sin embargo, la presente descripción no está limitada por los valores numéricos descritos anteriormente. Las dosis y los procedimientos de administración varían de acuerdo con el peso del paciente, edad, síntomas, y similares. Los expertos en la técnica pueden establecer dosis y procedimientos de administración adecuados en consideración de los factores descritos anteriormente.

Los aminoácidos contenidos en las secuencias de aminoácidos de la presente invención se pueden modificar después de la traducción. Por ejemplo, la modificación de una glutamina N-terminal en un ácido piroglutámico por piroglutamilación es bien conocida por los expertos en la técnica. Naturalmente, tales aminoácidos modificados después de la traducción se incluyen en las secuencias de aminoácidos de la presente invención.

Ejemplos

A continuación en la presente memoria, la presente descripción se describirá en forma específica con referencia al Ejemplo.

[Ejemplo 1] Estudio sobre la mejora del efecto de aceleración de la eliminación de antígeno de los anticuerpos

Anticuerpo anti-receptor IL-6

Preparación del anticuerpo anti-receptor IL-6 humano que tiene actividad de unión a FcRn en condiciones neutras

H54/L28-IgG1 que comprende H54 (SEC ID NO: 1) y L28 (SEC ID NO: 2) descrito en el documento WO 2009/125825 es un anticuerpo anti-receptor IL-6 humanizado. Se introdujeron mutaciones en H54 (SEC ID NO: 1) para aumentar la unión a FcRn en la condición de pH neutro (pH7,4). En forma específica, H54-IgG1-F14 (SEC ID NO: 3) se preparó a partir de la región constante de la cadena pesada de IgG1 mediante la sustitución de Met por Trp en la posición 252 y Asn por Trp en la posición 434 en la numeración EU. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrito en el Ejemplo de referencia 1.

H54/L28-IgG1 que comprende H54 (SEC ID NO: 1) y L28 (SEC ID NO: 2) y H54/L28-IgG1-F14 que comprende H54-IgG1-F14 (SEC ID NO: 3) y L28 (SEC ID NO: 2) se expresaron y purificaron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 2.

Estudio in vivo de anticuerpos mediante el modelo de infusión en estado estacionario usando línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano

Usando H54/L28-IgG1 y H54/L28-IgG1-F14 preparados como se describió anteriormente, se realizó una prueba in vivo mediante el modelo de infusión en estado estacionario using línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano. Se implantó una bomba de infusión (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004, alzet) que contiene el receptor de IL-6 humano soluble bajo la piel en la parte posterior de la línea de ratón transgénico FcRn 276 (B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg línea 276 +/+ ratón (B6.mFcRn-/-hFCRN Tg276 B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT)276Dcr (Jackson #4919)), Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104) para preparar animales modelo donde la concentración plasmática del receptor de IL-6 humano soluble se mantuvo constante. Se administraron anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano a los animales modelo para evaluar la dinámica in vivo después de la administración del receptor de IL-6 humano soluble. Se administró anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón (R & D) a 20 mg/kg antes de implantar la bomba de infusión y 14 días después de la administración del anticuerpo en la vena caudal para suprimir la producción de anticuerpo neutralizante contra el receptor de IL-6 humano soluble. A continuación, se implantó una bomba de infusión que contiene 92,8 microgramos/ml de receptor de IL-6 humano soluble bajo la piel en la parte posterior de los ratones. Tres días después de la implantación de una bomba de infusión, se administraron anticuerpos anti-receptor IL-6 humano (H54/L28-IgG1 y H54/L28-IgG1-F14) a 1 mg/kg una vez en la vena caudal. La sangre se recolectó durante 15 minutos, siete horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, siete

días, 14 días, 21 días y 28 días después de la administración del anticuerpo anti-receptor IL-6 humano. La sangre recolectada se centrifugó inmediatamente a 15,000 rpm y 4 grados C durante 15 minutos para separar el plasma. El plasma separado se almacenó en un refrigerador a -20 grados C o menos antes del ensayo.

Determinación de la concentración de hsIL-6R plasmática por el ensayo de electroaquimioluminiscencia

La concentración de hsIL-6R en plasma de ratón se midió por electroquimioluminiscencia. Se ajustaron muestras de la curva de calibración de hsIL-6R a concentraciones de 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 pg/ml, y se prepararon muestras de plasma de ratón diluidas 50 veces o más. Las muestras se mezclaron con una solución de anticuerpo anti-IL-6R (R & D) monoclonal marcado con rutenio con Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery), anticuerpo anti-IL-6R humana biotinilada (R & D) y WT-IgG1, y después se dejó reaccionar durante la noche a 37 ºC. La concentración final de WT-IgG1 como anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano, que comprendía H (WT)(SEC ID NO: 4) y L (WT) (SEC ID NO: 5), fue de 333 microgramos/ml, que es superior a la concentración de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano contenida en las muestras, con el fin de unir casi todas las moléculas de hsIL-6R en las muestras a WT -IgG1. Posteriormente, las muestras se dispensaron en una placa de estreptavidina MA400 PR (Meso Scale Discovery), y se dejaron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente, y se realizó el lavado. Inmediatamente después de que se dispensó Tampón de lectura T (x4) (Meso Scale Discovery), la medición fue realizada por el lector Sector PR 400 (Meso Scale Discovery). La concentración de hsIL-6R se calculó sobre la base de la respuesta de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración de hsIL-6R plasmática después de la administración intravenosa de H54/L28-IgG1 y H54/L28-IgG1-F14 medida por este procedimiento se muestra en la Fig. 1.

Como se muestra en la Fig. 1, en comparación con la concentración basal de hsIL-6R sin anticuerpo, la administración de H54/L28-IgG1 dio como resultado una elevación significativa de la concentración de hsIL-6R plasmática. Por otra parte, la administración de H54/L28-IgG1-F14 dio como resultado una reducción de la elevación de la concentración de hsIL-6R plasmática. en comparación con H54/L28-IgG1. Esta reducción en la elevación se deriva del aumento de la unión de FcRn humano a pH neutro en H54/L28-IgG1-F14 en comparación con H54/L28-IgG1. Esto demuestra que el aumento de la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn a pH neutro podría mejorar la eliminación del antígeno, aunque la extensión de la mejora de la eliminación antigénica fue pequeña para H54/L28-IgG1-F14 en comparación con H54/L28-IgG1.

[Ejemplo 2] Estudio sobre la mejora del efecto de aceleración de la eliminación del antígeno de anticuerpos de unión al antígeno dependiente de pH (preparación de anticuerpos)

Con respecto al anticuerpo de unión al receptor IL-6 humano dependiente del pH

H54/L28-IgG1 que comprende H54 (SEC ID NO: 1) y L28 (SEC ID NO: 2) que se describe en el documento 2009/125825 es un anticuerpo anti-receptor IL-6 humanizado. Fv4-IgG1 que comprende VH3-IgG1 (SEC ID NO: 6) y VL3-CK (SEC ID NO: 7) es un anticuerpo anti-receptor IL-6 humanizado que resulta de conferir a H54/L28-IgG1 la propiedad de unirse al receptor IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH (que se une a pH 7,4 pero se disocia a pH 5,8). La prueba in vivo que se describe en el documento 2009/125825 usando ratones demostró que la eliminación del receptor IL-6 humano soluble se puede acelerar mucho en un grupo al que se administra una mezcla de Fv4-IgG1 y receptor IL-6 humano soluble como el antígeno en comparación con un grupo tratado con una mezcla de H54/L28-IgG1 y receptor IL-6 humano soluble como el antígeno.

El receptor IL-6 humano soluble unido a un anticuerpo ordinario que se une al receptor IL-6 humano soluble se recicla en el plasma junto con el anticuerpo por medio de FcRn. Entretanto, un anticuerpo que se une al receptor IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH se disocia del receptor IL-6 humano soluble que se ha unido al anticuerpo en condiciones ácidas en el endosoma. El receptor IL-6 humano soluble disociado se degrada en el lisosoma. Esto puede acelerar mucho la eliminación del receptor IL-6 humano soluble. Luego, el anticuerpo que se une al receptor IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH se recicla al plasma por medio de FcRn. El anticuerpo reciclado se puede unir a otro receptor IL-6 humano soluble nuevamente. Mediante la repetición de este ciclo, una molécula de anticuerpo única se puede unir repetidamente a los receptores IL-6 humano solubles múltiples veces (Fig. 2).

Los anticuerpos que se unen a antígenos de una manera dependiente del pH aceleran la eliminación del antígeno soluble. Los anticuerpos producen el efecto mediante la unión repetida a antígenos solubles múltiples veces. Por lo tanto, tales anticuerpos son muy útiles. Se ensayó un procedimiento para aumentar la unión de FcRn en una condición neutra (pH 7,4) para potenciar adicionalmente el efecto facilitador de la eliminación del antígeno.

Preparación de los anticuerpos de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH que tienen actividad de unión a FcRn en condiciones neutras

Se introdujeron mutaciones en Fv4-IgG1 que comprende VH3-IgG1 (SEC ID NO: 6) y VL3-CK (SEC ID NO: 7) para aumentar la unión a FcRn en una condición neutra (pH 7,4). En forma específica, VH3-IgG1-v1 (SEC ID NO: 8) se preparó a partir de la región constante de la cadena pesada de IgG1 mediante la sustitución de Met por Tyr en la posición 252, Ser por Thr en la posición 254, y Thr por Glu en la posición 256 en la numeración EU, mientras que VH3-IgG1-v2 (SEC ID NO: 9) se construyó a partir de la región constante de la cadena pesada de IgG1 mediante la

sustitución de Asn por Trp en la posición 434 en la numeración EU. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 1.

H54/L28-IgG1 que comprende H54 (SEC ID NO: 1) y L28 (SEC ID NO: 2), Fv4-IgG1 que comprende VH3-IgG1 (SEC ID NO: 6) y VL3-CK (SEC ID NO: 7), Fv4-IgG1-v1 que comprende VH3-IgG1-v1 (SEC ID NO: 8) y VL3-CK (SEC ID NO: 7), y Fv4-IgG1-v2 que comprende VH3-IgG1-v2 (SEC ID NO: 9) y VL3-CK (SEC ID NO: 7) se expresaron y purificaron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 2.

[Ejemplo 3] Estudio sobre la mejora del efecto de aceleración de la eliminación del antígeno de anticuerpos de unión al antígeno dependiente de pH (prueba in vivo)

Prueba in vivo usando ratones transgénicos que expresan FcRn humano y ratones normales

La cinética in vivo de hsIL-6R (receptor de IL-6 humano soluble: preparado como se describe en el Ejemplo de Referencia 3) y anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano se evaluó después de administrar hsIL-6R solo o hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor IL-6 humano en combinación con FcRn humanos de ratones transgénicos (ratones transgénicos que expresan FcRn humano) (B6.mFcRn - hFcRn Tg línea 276 +/+, Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104) y ratones normales (ratón C57BL/6J, Charles River, Japón). Se administró una solución de hsIL-6R (5 microgramos/ml) o una solución de mezcla que contiene hsIL-6R y anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano (5 microgramos/ml y 0,1 mg/ml, respectivamente) una vez a una dosis de 10 ml/ kg en la vena caudal. En este caso, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano está presente en exceso sobre hsIL-6R, y por lo tanto se supone que casi todo hsIL-6R está unido al anticuerpo. Se recogió sangre 15 minutos, siete horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, siete días, 14 días, 21 días y 28 días después de la administración. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15,000 rpm y 4 grados C durante 15 minutos para separar el plasma. El plasma separado se almacenó en un refrigerador a o por debajo de -20 grados C antes del ensayo. Los anticuerpos anti-receptor humano de IL-6 utilizados son: H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1 y Fv4-IgG1-v2 descritos anteriormente para ratones transgénicos que expresan FcRn humano, y H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 para ratones normales.

Medición de la concentración plasmática de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano por ELISA

La concentración de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano en plasma de ratón se midió mediante ELISA. Se dispensó un fragmento de anticuerpo F(ab')2 anti-IgG humana específica de cadena gamma) (Sigma) sobre una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 grados C para preparar placas inmovilizadas con anticuerpos anti-IgG- Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 y 0,0125 microgramos/ml y muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Se añadieron 200 microlitros (microL) de 20 ng/ml de hsIL-6R a 100 microlitros de las muestras de la curva de calibración y muestras de plasma, y después se dejaron reposar las muestras durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se dispensaron en las placas con anti-IgG humana inmovilizada, y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió anticuerpo Anti-IL-6R Biotinilado (R & D) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió anticuerpo estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente, y la reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato de micropocillo TMP un componente HRP (BioFX Laboratories) como sustrato. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración plasmática después de la administración intravenosa según se mide por este procedimiento se muestra en la Fig. 3 para ratones transgénicos que expresan FcRn humano y Fig. 5 para ratones normales.

Medición de concentración plasmática de hsIL-6R por el ensayo de electroquimioluminiscencia

La concentración de hsIL-6R en plasma de ratón se midió por electroquimioluminiscencia. Se ajustaron muestras de la curva de calibración de hsIL-6R a concentraciones de 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 pg/ml, y se prepararon muestras de plasma de ratón diluidas 50 veces o más. Las muestras se mezclaron con una solución de anticuerpo anti-IL-6R monoclonal (R & D) marcado con rutenio con Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery), anticuerpo anti-IL-6R humana biotinilada (R & D) y WT-IgG1, y después se dejó reaccionar durante la noche a 37 ºC. La concentración final de WT-IgG1 como anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano, que comprendía H (WT)(SEC ID NO: 4) y L (WT) (SEC ID NO: 5), fue de 333 microgramos/ml, que es superior a la concentración de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano contenida en las muestras, con el fin de unir casi todas las moléculas de hsIL-6R en las muestras a WT -IgG1. Posteriormente, las muestras se dispensaron en una placa de estreptavidina MA400 PR (Meso Scale Discovery), y se dejaron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente, y se realizó el lavado. Inmediatamente después de que se dispensó Tampón de lectura T (x4) (Meso Scale Discovery), la medición fue realizada por el lector Sector PR 400 (Meso Scale Discovery). La concentración de hsIL-6R se calculó sobre la base de la respuesta de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso

temporal de la concentración de hsIL-6R plasmática después de la administración intravenosa medida por este procedimiento se muestra en la Fig. 4 para ratones transgénicos que expresan FcRn humano y Fig. 6 para ratones normales.

Determinación de concentración de hsIL-6R libre en plasma por el ensayo de electroquimioluminiscencia

Para evaluar el grado de neutralización del receptor de IL-6 humano soluble en plasma, la concentración de receptor de IL-6 humano soluble libre de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano (no neutralizado por) (concentración libre de hsIL-6R) en plasma de ratón se determinó por ensayo de electroquimioluminiscencia. Todos los anticuerpos de tipo IgG (IgG de ratón, anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano y complejo anticuerpo anti-receptor IL-6 humano-receptor IL-6 humano soluble) en plasma se adsorbieron sobre la proteína A mediante la adición de 12 microlitros de cada uno de las muestras estándar hsIL -6R preparadas a 10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312,5 o 156,25 pg/ml y muestras de plasma de ratón sobre una cantidad apropiada de resina rProteína A Sefarosa flujo rápido (GE Healthcare) secada en una copa de filtro de 0,22 micrones (Millipore). A continuación, la solución en una copa se centrifugó usando una centrífuga de alta velocidad para recolectar la solución que pasó a través. La solución pasada no contiene complejo de anticuerpo anti-receptor IL-6 humano unido a proteína A- receptor IL-6 humano soluble. Por lo tanto, la concentración de hsIL-6R libre en plasma se puede determinar mediante la medición de la concentración de hsIL-6R en la solución pasante. A continuación, se mezcló la solución pasante con un anticuerpo monoclonal anti-IL-6R humano marcado con rutenio con SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) y un anticuerpo anti-IL-6R humano biotinilado (R & D). La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante una hora, y después se dividió en alícuotas en una placa de estreptavidina MA400 PR (Meso Scale Discovery). Después de otra hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa y se alicuotó el tampón de lectura T (x4) (Meso Scale Discovery). Inmediatamente, la placa se midió en el lector SECTOR PR 400 (Meso Scale Discovery). La concentración de hsIL-6R se calculó sobre la base de la respuesta en la curva estándar usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices). En la Fig. 7 se muestra un curso de tiempo de concentración libre de hsIL-6R en el plasma de ratones normales después de la administración intravenosa determinada por el procedimiento descrito anteriormente.

Efecto de la unión dependiente de pH al receptor IL-6 humano

H54/L28-IgG1 y Fv4-IgG1 que se une al receptor de IL-6 humano de una manera dependiente del pH se ensayaron in vivo y se compararon los resultados entre ellos. Como se muestra en las Figs. 3 y 5, la retención de anticuerpos en el plasma fue comparable. Mientras tanto, como se muestra en las Figs. 4 y 6, se observó que hsIL-6R administrado simultáneamente con Fv4-IgG1 que se une al receptor de IL-6 humano de una manera dependiente del pH acelera la eliminación de hsIL-6R en comparación con hsIL-6R administrada simultáneamente con H54/L28-IgG1. La tendencia anterior se observó tanto en ratones transgénicos que expresan FcRn humano como en ratones normales; por lo tanto, se demostró que al conferir una capacidad de unión al receptor de IL-6 humano dependiente del pH, la concentración de hsIL-6R plasmática cuatro días después de la administración podría disminuir en aproximadamente 17 y 34 veces, respectivamente.

Efecto de unión de FcRn en condiciones neutras (pH 7,4)

Se ha dado a conocer que IgG1 humana intacta apenas se une a (tiene una afinidad extremadamente baja para) FcRn humano en una condición neutra (pH 7,4). Se informó que la unión de FcRn humano en una condición neutra (pH 7,4) mediante la sustitución de Asn por Trp en la posición 434 (numeración EU) en IgG1 humana intacta (J Immunol. (2009) 182 (12): 7663-71). Fv4-IgG1-v2 que resulta de la introducción de la sustitución de aminoácidos anterior en Fv4-IgG1 se ensayó mediante una prueba in vivo usando ratones transgénicos que expresan FcRn humano. El resultado de la prueba se comparó con el de Fv4-IgG1. Como se muestra en la Fig. 3, la retención plasmática del anticuerpo fue comparable entre los dos. Mientras tanto, como se muestra en la Fig. 4, se observó que el hsIL-6R administrado simultáneamente con Fv4-IgG1-v2 que exhibe una unión a FcRn humano mejorada en una condición neutra (pH 7,4) se eliminó más rápidamente en comparación con hsIL-6R administrado simultáneamente con Fv4-IgG1. Por lo tanto, se demostró que al conferir la capacidad de unirse a FcRn humano en una condición neutra (pH 7,4), la concentración plasmática de hsIL-6R cuatro días después de la administración podría reducirse aproximadamente cuatro veces.

Sobre la base de la homología entre FcRn humano y FcRn de ratón, se asume que la sustitución de Asn por Trp en la posición 434 en la numeración EU para aumentar la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4). Entretanto, se ha dado a conocer que la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) aumenta mediante la sustitución de Metpor Tyr en la posición 252, Ser por Thr en la posición 254, y Thr por Glu en la posición 256 en la numeración EU (J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80). Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 que resulta de la introducción de la sustitución de aminoácidos descrita anteriormente en Fv4-IgG1 se analizaron in vivo usando ratones normales. Los resultados de la prueba se compararon con los de Fv4-IgG1. Como se muestra en la Fig. 5, los tiempos de retención plasmática de Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 que también habían mejorado para aumentar la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) se acortaron ligeramente (las concentraciones de anticuerpo neutralizante en plasma un día después de la administración se redujeron en aproximadamente 1,5 y 1,9 veces, respectivamente) en comparación con Fv4-IgG1.

Como se muestra en la Fig. 6, se demostró que hsIL-6R administrado simultáneamente con Fv4-IgG1-v1 o Fv4-IgG1-v2 que se había mejorado para aumentar la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) se elimina marcadamente más rápido en comparación con hsIL-6R administrado simultáneamente con Fv4-IgG1. Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 redujo las concentraciones de hsIL-6R plasmática un día después de la administración en aproximadamente 32 y 80 veces, respectivamente. En consecuencia, se reveló que la concentración plasmática se puede reducir al conferir capacidad de unión a en una condición neutra (pH 7,4). Como se describió anteriormente, al conferir capacidad de unión a en una condición neutra (pH 7,4), la concentración de anticuerpo en plasma se redujo ligeramente; sin embargo, se produjo el efecto de reducción de la concentración de hsIL-6R plasmática, que excedió en gran medida la disminución en la concentración del anticuerpo. Además, se halló que hsIL-6R administrado simultáneamente con Fv4-IgG1-v1 o Fv4-IgG1-v2 se elimina más rápido incluso cuando se comparó con el grupo tratado con hsIL-6R solo. Como se muestra en la Fig. 6, se demostró que hsIL-6R administrado simultáneamente con Fv4-IgG1-v1 o Fv4-IgG1-v2 puede reducir la concentración de hsIL-6R plasmática un día después de la administración en aproximadamente 4 o 11 veces, respectivamente, en comparación con hsIL-6R solo. En forma específica, esto significa que la eliminación del receptor IL-6 soluble se puede acelerar mediante la administración del anticuerpo que se une al receptor IL-6 soluble de una manera dependiente del pH y que se confiere con la capacidad de unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4). En forma específica, la concentración de antígeno en plasma se puede reducir in vivo mediante la administración de tal anticuerpo al cuerpo.

Como se muestra en la Fig. 7, el hsIL-6R libre se encontraba en un intervalo de concentración detectable durante siete días después de la administración de H54/L28-IgG1, mientras que hsIL-6R libre era indetectable después de un día después de la administración de Fv4-IgG1. Por otra parte, hsIL-6R libre no fue detectable después de siete horas después de la administración de Fv4-IgG1-v1 o Fv4-IgG1-v2. Específicamente, la concentración de hsIL-6R libre era menor en presencia de Fv4-IgG1 que se une a hsIL-6R de una manera dependiente del pH en comparación con H54/L28-IgG1, lo que sugiere que se produjo un fuerte efecto neutralizador de hsIL-6R al conferir la capacidad de unión a hsIL-6R dependiente del pH. Además, la concentración de hsIL-6R libre era mucho menor en presencia de Fv4-IgG1-v1 o Fv4-IgG1-v2, ambas modificadas a partir de Fv4-IgG1 para aumentar la capacidad de unión a FcRn a pH 7,4. Esto demuestra que se puede producir un efecto neutralizante de hsIL-6R mucho más fuerte mediante el aumento la capacidad de unión a FcRn a pH 7,4.

Cuando se administra, un anticuerpo neutralizante ordinario tal como H54/L28-IgG1 reduce la eliminación de un antígeno de unión, lo que produce una retención plasmática del antígeno prolongada. No se prefiere que los anticuerpos administrados prolonguen la retención de plasma de un antígeno cuya acción está destinada a ser neutralizada por los anticuerpos. La retención plasmática del antígeno se puede acortar al conferir la dependencia del pH a la unión al antígeno (el anticuerpo se une en condiciones neutras pero se disocia en condiciones ácidas). En la presente invención, el tiempo de retención de antígeno en plasma también se podría acortar al conferir adicionalmente capacidad de unión a FcRn humana en una condición neutra (pH 7,4). Además, se demostró que en comparación con la eliminación del antígeno solo, la eliminación antigénica se podría aumentar mediante la administración de un anticuerpo que se une a un antígeno de una manera dependiente del pH, y que se confiere con capacidad de unión a FcRn en condiciones neutras (pH 7,4). Hasta la fecha, no hay ningún procedimiento disponible para aumentar la eliminación de antígenos mediante la administración de anticuerpos en relación con la eliminación del antígeno solo. Por lo tanto, los procedimientos establecidos como se describe en este Ejemplo son muy útiles como un procedimiento para eliminar antígenos del plasma mediante la administración de anticuerpos. Además, los presentes inventores descubrieron por primera vez la ventaja de aumentar la capacidad de unión a FcRn en condiciones neutras (pH 7,4). Además, v4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 que tienen diferentes sustituciones de aminoácidos que aumentan la capacidad de unión a FcRn en condiciones neutras (pH 7,4) produjeron efectos comparables. Esto sugiere que independientemente del tipo de sustitución de aminoácidos, cada sustitución de aminoácidos que aumenta la capacidad de unión a FcRn humano en una condición neutra (pH 7,4) tiene potencialmente un efecto de aceleración de la eliminación del antígeno. Específicamente, se pueden producir moléculas de anticuerpo que eliminan los antígenos del plasma cuando se administran usando las siguientes sustituciones de aminoácidos solas o en combinación:

una sustitución de aminoácido Pro por Ile en la posición 257 y una sustitución de aminoácido Gln por Ile en la posición 311 en la numeración EU, todos los cuales se han informado en J Biol Chem. 2007, 282(3): 1709-17; una sustitución de aminoácido Asn por Ala, Tyr, o Trp en la posición 434, una sustitución de aminoácido Met por Tyr en la posición 252, una sustitución de aminoácido Thr por Gln en la posición 307, una sustitución de aminoácido Val por Pro en la posición 308, una sustitución de aminoácido Thr por Gln en la posición 250, una sustitución de aminoácido Metpor Leu en la posición 428, una sustitución de aminoácido Glu por Ala en la posición 380, una sustitución de aminoácido Ala por Val en la posición 378, una sustitución de aminoácido Tyr por Ile en la posición 436 en la numeración EU, los cuales se han informado en J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71; una sustitución de aminoácido Metpor Tyr en la posición 252, una sustitución de aminoácido Ser por Thr en la posición 254, una sustitución de aminoácido Thr por Glu en la posición 256 en la numeración EU, todos los cuales se han informado en J Biol Chem. 18 de agosto de 2006, 281(33): 23514-24; una sustitución de aminoácido His por Lys en la posición 433, una sustitución de aminoácido Asn por Phe en la posición 434, y una sustitución de aminoácido Tyr por His en la posición 436 en la numeración EU, todos los cuales se han informado en Nat Biotechnol. Octubre de 2005 23(10): 1283-8; y similares.

[Ejemplo 4] Evaluación de la actividad de unión a FcRn humano

Para el sistema de ensayo basado en Biacore para probar la interacción entre el anticuerpo y FcRn, se describe en J Immunol un sistema que inmoviliza el anticuerpo en un chip de sensor y utiliza FcRn humano como analito J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71. Para este propósito, se preparó FcRn humano como se describe en el Ejemplo de Referencia 4. Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 se evaluaron para la actividad de unión a FcRn humano (constante de disociación (KD)) a pH 6,0 y pH 7,4 usando el sistema descrito anteriormente. Los anticuerpos se analizaron como sustancia de prueba después de la inmovilización directa en el chip sensor CM5 de la serie S. Utilizando un kit de acoplamiento de amino de acuerdo con el manual de instrucciones del proveedor, los anticuerpos se inmovilizaron en el chip sensor para asegurar una cantidad de inmovilización de 500 RU. El tampón de corrida usado fue Na-fosfato 50 mmol/l/NaCl 150 mmol/l que contiene tensioactivo P20 0,05% (v/v%) (pH 6,0).

Con los chips de sensores preparados, se llevó a cabo el ensayo usando como tampón de corrida, Na-fosfato 50 mmol/l/NaCl 150 mmol/l que contiene tensioactivo P20 0,05% (pH 6,0) o Na-fosfato 50 mmol/l/NaCl 150 mmol/l que contiene tensioactivo P20 0,05% (pH 7,4). Los ensayos se llevaron a cabo exclusivamente a 25 grados C. Las soluciones de FcRn humanas diluidas y el tampón de corrida como solución de referencia se inyectaron a un caudal de flujo de 5 microlitros/minuto durante diez minutos para permitir que el FcRn humano interactúe con el anticuerpo en el chip. A continuación, se inyectó el tampón de corrida a un caudal de flujo de 5 microlitros/minuto durante un minuto para controlar la disociación de FcRn. A continuación, se regeneró el chip sensor mediante dos rondas de inyección de Tris-HCl 20 mmol/l/NaCl 150 mmol/l (pH 8,1) a un caudal de flujo de 30 microlitros/minuto durante 15 segundos.

Los resultados del ensayo se analizaron usando Software de Evaluación Biacore T100 (Ver. 2,0,1). mediante un procedimiento de afinidad en estado estacionario, se calculó la constante de disociación (KD) a partir de los resultados del ensayo a seis concentraciones diferentes de FcRn. Los resultados sobre las actividades de unión a FcRn humano (constantes de disociación (KD)) de Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 a pH 6,0 y pH 7,4 se muestran en la Tabla 5 a continuación.

[Tabla 5]

	KD(μM)	
	pH6,0	pH7,4
Fv4-IgG1	1,99	NA
Fv4-IgG1-v1	0,32	36,55
Fv4-IgG1-v2	0,11	11,03

A pH 7,4, la unión de FcRn humano a Fv4-IgG1 era demasiado débil para determinar el valor de KD (NA). Mientras tanto, se observó que Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 se unían a FcRn humano a pH 7,4, y se determinó que los valores de KD eran 36,55 y 11,03 micromolar, respectivamente. Los valores de KD para FcRn humano a pH 6,0 se determinaron que eran 1,99, 0,32 y 0,11 micromolar. Como se muestra en la Fig. 3, en comparación con Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v2 aceleró la eliminación de hsIL-6R en ratones transgénicos que expresan FcRn humano. Por lo tanto, se puede predecir que la eliminación del antígeno se acelera aumentando la unión de FcRn humano a pH 7,4 al menos para ser mayor de 11,03 micromolar por alteración de IgG1 humana. Mientras tanto, como se describe en J Immunol. (2002) 169 (9): 5171-80, la IgG1 humana se une aproximadamente diez veces más fuertemente al FcRn de ratón que al FcRn humano. Por este motivo, se predice también que Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 se unen aproximadamente diez veces más fuertemente a FcRn de ratón que FcR humano a pH 7,4. La aceleración de la eliminación de hsIL-6R por Fv4-IgG1-v1 o Fv4-IgG1-v2 en ratones normales mostrados en la Fig. 6 es más significativa que la aceleración de la eliminación por Fv4-IgG1-v2 en ratones transgénicos que expresan FcRn humano como se muestra en la Fig. 4. Esto sugiere que el grado de aceleración de la eliminación de hsIL-6R se incrementa de acuerdo con la fuerza de la unión de FcRn a pH 7,4.

[Ejemplo 5] Preparación de anticuerpos de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH con mejora de la unión a FcRn humano en condiciones neutras

Varias alteraciones para aumentar la unión a FcRn humano en una condición neutra se introdujeron en Fv4-IgG1 para mejorar adicionalmente el efecto de eliminación de antígeno del anticuerpo de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH en ratones transgénicos que expresan FcRn humano. En forma específica, las alteraciones de aminoácidos mostradas en las Tablas 6-1 y 6-2 se introdujeron en la región constante de la cadena pesada de Fv4-IgG1 para producir varias mutantes (números de aminoácido de los sitios de mutación se presentan de acuerdo con

la numeración EU). Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica descritos en el Ejemplo de referencia 1.

[Tabla 6-1]

NOMBRE DE MUTANTE	KD (M)	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
IgG1	ND	NINGUNO
IgG1-v1	3,2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8,1E-07	N434W
IgG1-F3	2,5E-06	N434Y
IgG1-F4	5,8E-06	N434S
IgG1-F5	6,8E-06	N434A
IgG1-F7	5,6E-06	M252Y
IgG1-F8	4,2E-06	M252W
IgG1-F9	1,4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6,9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3,1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1,7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3,2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1,8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4,6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4,6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3,0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2,0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9,2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1,0E-06	I332V
IgG1-F27	7,4E-06	G237M
IgG1-F29	1,4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2,8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8,0E-07	S254T/N434W

NOMBRE DE MUTANTE	KD (M)	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
IgG1-F33	2,3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2,8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8,4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3,6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1,1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1,0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3,0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8,2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1,5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1,0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1,7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1,1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2,4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3,2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5,1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1,2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8,1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3,1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1,0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8,4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9,4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1,1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7,7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2,4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1,1E-05	G385H
IgG1-F61	9,7E-07	G385H/N434W

NOMBRE DE MUTANTE	KD (M)	ALTERACIÓN DE AMINOÁCIDO
IgG1-F62	1,9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2,5E-06	N434F
IgG1-F64	5,3E-06	N434H

Tabla 6-2 es la continuación de la Tabla 6-1.

[Tabla 6-2]

IgG1-F65	2,9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4,3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6,3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9,3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5,1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1,5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8,3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2,0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1,7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4,6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1,4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1,0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9,9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7,8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5,9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2,7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1,6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1,1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2,6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2,8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5,5E-07	M252W/T256Q/N434Y

IgG1-F86	1,5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4,3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1,9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3,6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1,9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4,8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1,1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7,4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3,7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2,6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6,2E-07	M252Y/T256E/N434H

Las variantes que comprende una cadena pesada y L preparada (WT) (SEC ID NO: 5) se expresaron y purificaron mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica como se describe en el Ejemplo de referencia 2.

Evaluación de la unión de FcRn humano

La unión entre anticuerpo y FcRn humano se analizó cinéticamente usando Biacore T100 (GE Healthcare). Para este propósito, se preparó FcRn humano como se describe en el Ejemplo de Referencia 4. Una cantidad apropiada de proteína L (ACTIGEN) se inmovilizó sobre el chip Sensor CM4 (GE Healthcare) por el procedimiento de acoplamiento amino, y se dejó que el chip capture un anticuerpo de interés. A continuación, se inyectaron soluciones de FcRn diluidas y tampón de corrida (como una solución de referencia) para permitir que el FcRn humano interactúe con el anticuerpo capturado en el chip sensor. El tampón de corrida utilizado comprendía 50 mmol/l de fosfato de sodio, 150 mmol/l de NaCl y 0,05% (p/v) de Tween20 (pH 7,0). El FcRn se diluyó usando cada tampón. El chip se regeneró usando 10 mmol/l de glicina-HCl (pH 1,5). Los ensayos se realizaron exclusivamente a 25 ºC. La constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y la constante de velocidad de disociación k_d (1/s), ambos parámetros cinéticos, se calcularon sobre la base de los sensorgramas obtenidos en los ensayos y se determinó la KD (M) de cada anticuerpo para FcRn humano a partir de estos valores. Cada parámetro se calculó usando Biacore T100 Software de evaluación (GE Healthcare).

El resultado de la evaluación en la unión de FcRn humano en una condición neutra (pH 7,0) por Biacore se muestra en las Tablas 6-1 y 6-2. La KD de la IgG1 intacta no se pudo calcular porque presentaba una unión muy débil. Por lo tanto, el KD se indica como ND en la Tabla 6-1.

[Ejemplo 6] Prueba in vivo de los anticuerpos de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH con mejora de la unión de FcRn humano en la condición neutra

Los anticuerpos de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH que tienen capacidad de unión a FcRn humano en una condición neutra se produjeron usando las cadenas pesadas preparadas como se describe en el Ejemplo 4 para tener capacidad de unión a FcRn humano en una condición neutra. Los anticuerpos se evaluaron por su efecto de eliminación de antígeno in vivo. En forma específica, los anticuerpos listados a continuación se expresaron y purificaron mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica como se describe en el Ejemplo de referencia 2:

Fv4-IgG1 que comprende VH3-IgG1 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-v2 que comprende VH3-IgG1-v2 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F14 que comprende VH3-IgG1-F14 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F20 que comprende VH3-IgG1-F20 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F21 que comprende VH3-IgG1-F21 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F25 que comprende VH3-IgG1-F25 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F29 que comprende VH3-IgG1-F29 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F35 que comprende VH3-IgG1-F35 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F48 que comprende VH3-IgG1-F48 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F93 que comprende VH3-IgG1-F93 y VL3-CK; y

Fv4-IgG1-F94 que comprende VH3-IgG1-F94 y VL3-CK.

Mediante los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 3, los anticuerpos de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH preparados se analizaron in vivo usando ratones transgénicos que expresan FcRn humano (B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg línea 276 +/+ ratón, Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104).

Un curso temporal de concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble después de la administración intravenosa a ratones transgénicos que expresan FcRn humano se muestra en la Fig. 8. El resultado de la prueba mostró que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble permaneció baja en el tiempo en presencia de cualquiera de los anticuerpos de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH con unión a FcRn humano aumentada en condiciones neutras, en comparación con en presencia de Fv4-IgG1 que casi no tiene capacidad de unión a FcRn humano en condiciones neutras. Entre otros, los anticuerpos que produjeron el efecto notable incluyen, por ejemplo, Fv4-IgG1-F14. Se demostró que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble administrado simultáneamente con Fv4-IgG1-F14 se reduce en aproximadamente 54 veces un día después de la administración en comparación con la del receptor IL-6 humano soluble administrado simultáneamente con Fv4-IgG1. Además, se demostró que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble administrado simultáneamente con Fv4-IgG1-F21 se reduce en aproximadamente 24 times siete horas después de la administración en comparación con la del receptor IL-6 humano soluble administrado simultáneamente con Fv4-IgG1. Además, la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble administrado simultáneamente con Fv4-IgG1-F25 siete horas después de la administración estaba por debajo del límite de detección (1,56 ng/ml). En consecuencia, se esperaba que Fv4-IgG1-F25 permita una marcada reducción de 200 o más veces en la concentración del receptor IL-6 humano soluble con respecto a la concentración del receptor IL-6 humano soluble administrado simultáneamente con Fv4-IgG1. Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que el aumento de la unión de FcRn humano de los anticuerpos de unión al antígeno dependiente de pH en una condición neutra es altamente efectiva para mejorar el efecto de eliminación de antígeno. Entretanto, el tipo de alteración de aminoácido para aumentar la unión a FcRn humano en condiciones neutras, que se introduce para mejorar el efecto de eliminación de antígeno, no está particularmente limitado; y tales alteraciones incluyen las que se muestran en las Tablas 6-1 y 6-2. Se puede predecir que el efecto de eliminación de antígeno mejora in vivo por cualquier alteración introducida.

Además, la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble administrado simultáneamente con uno de los cuatro tipos de anticuerpos de unión al receptor IL-6 humano dependiente de pH, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, y Fv4-IgG1-F48, permaneció más bajo en el tiempo que el del receptor IL-6 humano soluble administrado solo. Tal anticuerpo de unión al receptor IL-6 humano dependiente del pH se puede administrar al cuerpo donde la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble se mantiene constante (estado estacionario) para mantener la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble más baja que concentración plasmática en estado estacionario. En forma específica, la concentración plasmática del antígeno in vivo se puede reducir mediante la administración de tal anticuerpo al cuerpo.

[Ejemplo 7] Evaluación para la efectividad de la Fv4-IgG1-F14 de baja dosis (0,01 mg/kg)

La Fv4-IgG1-F14 preparada como se describió en el Ejemplo 6 se analizó a una dosis baja (0,01 mg/kg) por el mismo procedimiento de prueba in vivo como se describió en el Ejemplo 6. El resultado (mostrado en la Fig. 9) se comparó con el que se describió en el Ejemplo 6, que se obtuvo mediante la administración de Fv4-IgG1 y Fv4-IgG1-F14 a 1 mg/kg.

El resultado mostró que la concentración de anticuerpo en plasma en el grupo tratado con Fv4-IgG1-F14 a 0,01 mg/kg fue aproximadamente de 100 veces más bajo en comparación con el grupo tratado a 1 mg/kg (Fig. 10), los cursos temporales de concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble fueron comparables entre sí. Además, se demostró que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble siete horas después de la administración en el grupo tratado con Fv4-IgG1-F14 a razón de 0,01 mg/kg se redujo en aproximadamente tres veces en comparación con el del grupo tratado con Fv4-IgG1 a 1 mg/kg. Además, en la presencia de Fv4-IgG1-F14, la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble fue más baja en el tiempo en ambos grupos tratados con diferentes dosis cuando se comparó con el grupo tratado con el receptor IL-6 humano soluble solo.

El hallazgo demuestra que incluso cuando se administra a una dosis un centésimo de la de Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-F14

que resulta de la modificación de Fv4-IgG1 para aumentar la unión de FcRn humano en una condición neutra reduce efectivamente la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble. Específicamente, se predice que los antígenos se pueden eliminar eficientemente incluso a una dosis inferior cuando se modifica un anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH para aumentar su capacidad de unión a FcRn en condiciones neutras.

[Ejemplo 8] Prueba in vivo basada en el modelo en estado estacionario usando ratones normales

Evaluación de la unión a FcRn de ratón en condiciones neutras

VH3/L (WT)-IgG1 que comprende VH3-IgG1 (SEC ID NO: 6) y L (WT) (SEC ID NO: 5), VH3/L (WT)-IgG1-v2 que comprende VH3-IgG1-v2 (SEC ID NO: 9) y L (WT) (SEC ID NO: 5), y VH3/L (WT)-IgG1-F20 que comprende VH3-IgG1-F20 (SEC ID NO: 10) y L (WT) (SEC ID NO: 5), lo cuales se prepararon como se describió en el Ejemplo 5, se evaluaron para determinar la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) por el procedimiento descrito a continuación.

La unión entre anticuerpo y FcRn humano se analizó cinéticamente usando Biacore T100 (GE Healthcare). Una cantidad apropiada de proteína L (ACTIGEN) se inmovilizó sobre el chip Sensor CM4 (GE Healthcare) por el procedimiento de acoplamiento amino, y se dejó que el chip capture un anticuerpo de interés. A continuación, se inyectaron soluciones de FcRn diluidas y tampón de corrida (como una solución de referencia) para permitir que el FcRn humano interactúe con el anticuerpo capturado en el chip sensor. El tampón de corrida utilizado contiene 50 mmol/l de fosfato de sodio, 150 mmol/l de NaCl y 0,05% (p/v) de Tween20 (pH 7,0). El FcRn se diluyó usando cada tampón. El chip se regeneró usando 10 mmol/l de glicina-HCl (pH 1,5). Los ensayos se realizaron exclusivamente a 25 ºC. La constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y la constante de velocidad de disociación k_d (1/s), ambos parámetros cinéticos, se calcularon sobre la base de los sensorgramas obtenidos en los ensayos y se determinó la KD (M) de cada anticuerpo para FcRn humano a partir de estos valores. Cada parámetro se calculó usando Biacore T100 Software de evaluación (GE Healthcare).

El resultado se muestra en la Tabla 7 (afinidad por FcRn de ratón a pH 7,4). VH3/L (WT)-IgG1 (IgG1 de la Tabla 7) cuya región constante que es la de la IgG1 intacta exhibió solo una unión muy débil a FcRn de ratón. En consecuencia, la KD no se pudo calcular y se indica como ND de la Tabla 7. El resultado de ensayo mostró que los anticuerpos alterados con mejor unión a FcRn humano en condiciones neutras también exhibieron unión aumentada a FcRn de ratón en la condición neutra.

[Tabla 7]

	KD (M)
IgG1	ND
IgG1-v2	1,04E-06
IgG1-F20	1,17E-07

Prueba in vivo usando ratones normales con una concentración plasmática constante del receptor IL-6 humano soluble

Usando H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v2, y Fv4-IgG1-F20 preparado como se describe en los Ejemplos 1 y 5, se realizó una prueba in vivo por el procedimiento descrito anteriormente.

Prueba de infusión in vivo usando ratones normales

Se implantó una bomba de infusión (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004, alzet) que contiene el receptor de IL-6 humano soluble bajo la piel en la parte posterior de ratones normales (ratones C57BL/6J y Charles River Japón) para preparar animales modelo donde la concentración plasmática del receptor de IL-6 humano soluble se mantuvo constante. Se administraron anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano a los animales modelo para evaluar la dinámica in vivo después de la administración del receptor de IL-6 humano soluble. El anticuerpo anti-CD4 monoclonal de ratón (R & D) se administró a 20 mg/kg una vez en la vena caudal para suprimir la producción de anticuerpo neutralizante contra el receptor de IL-6 humano soluble. A continuación, se implantó una bomba de infusión que contiene 92,8 microgramos/ml de receptor de IL-6 humano soluble bajo la piel en la parte posterior de los ratones. Tres días después de la implantación de una bomba de infusión, se administraron anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano a 1 mg/kg una vez en la vena caudal. La sangre se recogió durante 15 minutos, siete horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, siete días, 14 días, 21 días y 28 días después de la administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15,000 rpm y 4 grados C durante 15 minutos para separar el plasma. El plasma separado se almacenó en un refrigerador a o por debajo de

-20 grados C antes del ensayo.

Determinación de la concentración plasmática de anticuerpos anti-receptor IL-6 humano por ELISA

El procedimiento usado fue el mismo que se describió en el Ejemplo 3.

Determinación de la concentración de hsIL-6R plasmática por el ensayo de electroquimioluminiscencia.

El procedimiento usado fue el mismo que se describió en el Ejemplo 1.

Como se muestra en la Fig. 11, la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble se elevó a 650 ng/ml (15 veces antes de la administración) cuando H54/L28-IgG1,un anticuerpo neutralizante contra el receptor IL-6 humano soluble, se administró a ratones normales (grupo hsIL-6R) en que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble se mantuvo constante a aproximadamente 40 ng/ml. Por otra parte, la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble se mantuvo a aproximadamente 70 ng/ml en el grupo tratado con Fv4-IgG1 que resulta de conferir a H54/L28-IgG1 una capacidad de unión al antígeno dependiente de pH. Esto sugiere que el aumento en la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble causado mediante la administración de la H54/L28-IgG1, un anticuerpo neutralizante ordinario, se puede suprimir en aproximadamente un décimo al conferir la capacidad de unión dependiente de pH.

Además, se demostró que la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble se mantiene en o por debajo de un décimo de la concentración en estado estacionario mediante la administración Fv-IgG1-v2 o Fv-IgG1-F20, los cuales resultaron de la introducción de una alteración en un anticuerpo de unión al receptor IL-6 humano dependiente del pH para aumentar la unión a FcRn en condiciones neutras. Cuando Fv-IgG1-v2 se administró, la concentración plasmática del receptor IL-6 humano soluble 14 días después de la administración fue aproximadamente 2 ng/ml. En consecuencia, Fv-IgG1-v2 puede reducir la concentración a 1/20 del nivel antes de la administración. Entretanto, cuando se administró Fv-IgG1-F20, las concentraciones plasmáticas del receptor IL-6 humano soluble siete horas, un día, dos días, y cuatro días después de la administración estaban por debajo del límite de detección (1,56 ng/ml). Esto sugiere que Fv-IgG1-F20 redujo la concentración a o por debajo 1/25 del nivel antes de la administración.

Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que la concentración de antígeno en plasma se puede reducir de manera significativa mediante el aumento de la velocidad de eliminación de antígeno en plasma, mediante la administración de un anticuerpo que tiene capacidad de unión al antígeno y capacidad de unión a FcRn en la condición neutra a animales modelo en que la concentración de antígeno en plasma se mantiene constante.

Los anticuerpos típicos tales como H54/L28-IgG1 solo pueden neutralizar la acción de un antígeno blanco mediante la unión al antígeno blanco, e incluso peor aumentan la concentración de antígeno en plasma. Por el contrario, se encontró que los anticuerpos que tenían tanto la capacidad de unión al antígeno como la capacidad de unión a FcRn dependiente del pH en condiciones neutras eran capaces de no solo neutralizar el antígeno blanco, sino también reduce la concentración plasmática del antígeno blanco. Se puede esperar que el efecto de la eliminación del antígeno del plasma sea más beneficioso que la neutralización. Además, la eliminación del antígeno también puede actuar para los antígenos blanco que son insuficientemente efectivos por neutralización sola.

[Ejemplo 9] Identificación de umbral de la afinidad de unión al FcRn humano al pH neutro requerido para mejorar la eliminación de antígeno y la relación entre la eliminación de antígeno y la afinidad de unión al FcRn humano a pH neutro

Preparación de anticuerpo para el estudio in vivo

Se generaron variantes de Fc de Fv4-IgG1 que comprenden VH3-IgG1 (SEC ID NO: 6) y VL3-CK (SEC ID NO: 7) con aumento de la unión a FcRn en pH neutro. En forma específica, se prepararon VH3-M73 (SEC ID NO: 15) y VH3-IgG1-v1 (SEC ID NO: 8). Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica descritos en el Ejemplo de referencia 1.

H54/L28-IgG1 que comprende H54 (SEC ID NO: 1) y L28 (SEC ID NO: 2), Fv4-IgG1 que comprende VH3-IgG1 (SEC ID NO: 6) y VL3-CK (SEC ID NO: 7), Fv4-M73 que comprende VH3-M73 (SEC ID NO: 15) y VL3-CK (SEC ID NO: 7), Fv4-IgG1-v1 que comprende VH3-IgG1-v1 (SEC ID NO: 8) y VL3-CK (SEC ID NO: 7), y Fv4-IgG1-v2 que comprende VH3-IgG1-v2 (SEC ID NO: 9) y VL3-CK (SEC ID NO: 7), se expresaron y purificaron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 2.

Evaluación de la afinidad de unión de anticuerpos a FcRn humano en condición de pH neutro

VH3/L (WT)-IgG1 que comprende VH3-IgG1 (SEC ID NO: 6) y L (WT) (SEC ID NO: 5), VH3/L (WT)-M73 que comprende VH3-M73 (SEC ID NO: 15) y L (WT) (SEC ID NO: 5), VH3/L (WT)-IgG1-v1 que comprende VH3-IgG1-v1 (SEC ID NO: 8) y L (WT) (SEC ID NO: 5), y VH3/L (WT)-IgG1-v2 que comprende VH3-IgG1-v2 (SEC ID NO: 9) y L (WT) (SEC ID NO: 5), las cuales se prepararon como se describió en el Ejemplo 2, se evaluaron para determinar la unión a FcRn humano en un pH neutro (pH 7,0).

La actividad de unión de VH3/L (WT)-IgG1-v1 y VH3/L (WT)-IgG1-v2 a FcRn humano se midió usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. Debido a la baja actividad de unión de VH3/L (WT)-IgG1 y VH3/L (WT)-M73 a FcRn humano, la actividad de unión a FcRn humano no se pudo medir usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 5, en consecuencia, estos anticuerpos se evaluaron por el procedimiento que se describe a continuación. La unión entre el anticuerpo y FcRn humano se analizó cinéticamente usando Biacore T100 (GE Healthcare). Una cantidad apropiada de proteína L (ACTIGEN) se inmovilizó sobre el chip Sensor CM4 (GE Healthcare) por el procedimiento de acoplamiento amino, y se dejó que el chip capture un anticuerpo de interés. A continuación, se inyectaron soluciones de FcRn diluidas y tampón de corrida para permitir que el FcRn humano interactúe con el anticuerpo capturado en el chip sensor. El tampón de corrida utilizado contiene 50 mmol/l de fosfato de sodio, 150 mmol/l de NaCl y 0,05% (p/v) de Tween20 (pH 7,0). El FcRn se diluyó usando cada tampón. El chip se regeneró usando 10 mmol/l de glicina-HCl (pH 1,5). Los ensayos se realizaron exclusivamente a 25 ºC.

La KD (M) de cada anticuerpo se derivó de los datos del sensorgrama usando el Software de Evaluación Biacore T100 (GE Healthcare), que simultáneamente se ajusta a las fases de asociación y disociación de los sensorgramas y ajusta globalmente todas las curvas del conjunto de trabajo. Los sensorgramas se ajustaron al modelo de unión 1: 1, el modelo de "unión a Langmuir", suministrado por Software de Evaluación Biacore T100. Para algunas de las interacciones de unión, KD se derivó por análisis de regresión no lineal de los gráficos de R_{eq}, la respuesta de unión de equilibrio, frente al log de la concentración de analito usando un enfoque basado en el equilibrio.

El resultado de la unión a FcRn humano en la condición neutra (pH 7,0) por Biacore se muestra en las Tablas 8.

[Tabla 8]

	KD (M)
IgG1	8,8E-05
M73	1,4E-05
IgG1-v1	3,2E-06
IgG1-v2	8,1E-07

Estudios in vivo del efecto de los anticuerpos sobre la eliminación de antígeno en el modelo de co-inyección usando la línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano

Se realizó el estudio in vivo de los anticuerpos usando el modelo de co-inyección como se describió en el Ejemplo 3. Los anticuerpos anti-receptor IL-6 humano usados en este estudio son los H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 descritos anteriormente. Los ratones usados en este estudio son los ratones transgénicos que expresan FcRn humano (B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg línea 276 +/+ mouse, Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104).

Como se muestra en la Fig. 12, la farmacocinética de H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1 y Fv4-IgG1-v2 fue comparable, y estos anticuerpos mantuvieron una concentración plasmática similar durante el estudio.

El curso temporal de la concentración plasmática de hsIL-6R se mostró en la Fig. 13. En comparación con el hsIl-6R administrado con Fv4-IgG1, el hsIL-6R administrado con Fv4-IgG1-v2 mostró una eliminación mejorada, mientras que el hsIL-6R administrado con Fv4-M73 y Fv4-IgG1-v1 exhibió una eliminación reducida. Aunque todas las variantes Fc, M73, v1 y v2 han aumentado la afinidad de unión a FcRn humano en condiciones de pH neutro (pH 7,0), se demostró que solo Fv4-IgG1-v2, pero no Fv4-M73 y Fv4-IgG1-v1, exhibió una eliminación de hsIL-6R mejorada. Esto indica que para mejorar la eliminación del antígeno, la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 necesita ser al menos más fuerte que IgG1-v1, cuya afinidad de unión a FcRn humano a pH 7 es KD 3,2 micromolar o 28 veces más fuerte que IgG1 humana intacta (la afinidad de unión a FcRn humano es KD 88 micromolar).

La Fig. 14 describe la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc a FcRn humano a pH7,0 y la concentración de hsIL-6R plasmática en el día 1 después de la co-inyección de hsIL-6R y las variantes Fc. Se grafican las variantes Fc descritas en este Ejemplo y Ejemplo 6 (Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1, Fv4-IgG1-v2, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F20, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, Fv4-IgG1-F29, Fv4-IgG1-F35, Fv4-IgG1-F48, Fv4-IgG1-F93, y Fv4-IgG1-F94). Mediante el aumento de la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH7,0, la concentración plasmática de hsIL-6R, que refleja la eliminación del antígeno, aumentó al principio, pero luego disminuyó rápidamente. Esto demuestra que a fin de aumentar la eliminación de antígeno en comparación con la IgG1 humana intacta, la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 con preferencia debe ser más

fuerte que KD 2,3 micromolar (valor obtenido del ajuste de la curva de la Fig. 14). La afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano entre KD 88 micromolar y KD 2,3 micromolar puede reducir la eliminación de antígeno (concentración de hsIL-6R mayor). En otras palabras, la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 con preferencia debe ser 38 veces mayor que IgG1 humana intacta para mejorar la eliminación de antígeno, o de otro modo reducir la eliminación de antígeno.

La Fig. 15 describe la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc a FcRn humano a pH 7,0 y la concentración de anticuerpo en plasma en el día 1 después de la co-inyección de hsIL-6R y variantes de Fc. Se grafican las variantes de Fc descritas en este Ejemplo y el Ejemplo 6 (Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1, Fv4-IgG1-v2, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F20, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, Fv4-IgG1-F29, Fv4-IgG1-F35, Fv4-IgG1-F48, Fv4-IgG1-F93, y Fv4-IgG1-F94. Mediante el aumento de la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0, la concentración plasmática del anticuerpo, que refleja la farmacocinética del anticuerpo (eliminación), se mantiene al principio, pero luego diminuye rápidamente. Esto demuestra que a fin de mantener la farmacocinética del anticuerpo similar a la IgG1 humana intacta (la afinidad de unión a FcRn humano es la KD 88 micromolar), la afinidad del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 debe ser más débil que la KD 0,2 micromolar (valor obtenido del ajuste de la curva de Fig. 15). La afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano más fuerte que la KD 0,2 micromolar aumentó la eliminación del anticuerpo (es decir, eliminación del anticuerpo más rápida de plasma). En otras palabras, la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 debe estar dentro de 440 veces mayor que IgG1 humana intacta para exhibir una farmacocinética del anticuerpo similar a la de IgG1 humana intacta, o producir de otro modo la eliminación rápida de anticuerpo del plasma.

En consideración de las Figs. 14 y 15, con el fin de aumentar la eliminación antigénica (es decir, reducir la concentración plasmática del antígeno) en comparación con IgG1, mientras que se mantiene la farmacocinética del anticuerpo similar a la IgG1 humana intacta, o en otras palabras, la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 debe estar dentro de un intervalo de 38 veces a 440 veces más fuerte que la IgG1 humana intacta. Dicho anticuerpo con una farmacocinética similar a IgG1 con actividad de eliminación de antígeno a largo plazo sería beneficioso para un tratamiento terapéutico de anticuerpos que requiera un intervalo de dosificación más largo, tal como una enfermedad crónica debido a su propiedad de acción prolongada.

Por otra parte, mediante el aumento de la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 más fuerte que KD 0,2 micromolar, o en otras palabras, mediante el aumento de la afinidad de unión del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 más de 440 veces en comparación con IgG1 humana intacta, puede aumentar la eliminación del antígeno en gran medida dentro de un corto plazo, aunque el anticuerpo se elimina del plasma más rápidamente que la IgG1 humana intacta. Dicho anticuerpo con capacidad de inducir una reducción rápida y fuerte de la concentración de antígeno sería beneficioso para terapéutico de anticuerpo tal como enfermedad aguda en la que el antígeno relacionado con la enfermedad necesita ser eliminado del plasma debido a su propiedad de acción rápida.

La cantidad de antígeno eliminado del plasma por anticuerpo es el factor importante para evaluar la eficiencia de la eliminación del antígeno mediante la administración de las variantes de anticuerpo Fc que tienen una afinidad de unión aumentada a FcRn humano a pH 7,0. Para evaluar la eficiencia de la eliminación del antígeno por anticuerpo, se realizó el siguiente cálculo en cada punto de tiempo del estudio in vivo descrito en este Ejemplo y en el Ejemplo 6.

valor A: Concentración molar de antígeno en cada punto de tiempo

valor B: Concentración molar de anticuerpo en cada punto de tiempo

valor C: Concentración molar de antígeno por concentración molar de anticuerpo (relación molar de antígeno/anticuerpo) en cada punto de tiempo

$$C=A/B$$

Los cursos temporales del valor C (relación molar de antígeno/anticuerpo) para cada anticuerpo se describieron en la Fig. 16. El menor valor C indica una mayor eficiencia de eliminación de antígeno por anticuerpo mientras que un valor C más alto indica una menor eficiencia de eliminación de antígeno por anticuerpo. Un valor más bajo C en comparación con IgG1 indica que se obtuvo una mayor eficiencia de eliminación de antígeno mediante las variantes de Fc, mientras que un valor C más alto comparado con IgG1 indica que las variantes de Fc tienen un efecto negativo en la eficiencia de eliminación de antígeno. Todas las variantes Fc excepto Fv4-M73 y Fv4-IgG1-v1 demostraron una eficiencia de eliminación de antígeno mejor en comparación con Fv4-IgG1. Fv4-M73 y Fv4-IgG1-v1 demostraron un impacto negativo en la eficiencia de eliminación de antígeno, lo cual fue coherente con la Fig. 14.

La Fig. 17 describe la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc al FcRn humano a pH 7,0 y el valor C (relación molar de antígeno/anticuerpo) en el día 1 después de la co-inyección de hsIL-6R y variantes de Fc. Se grafican las variantes de Fc descritas en este Ejemplo y el Ejemplo 6 (Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1, Fv4-IgG1-v2, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F20, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, Fv4-IgG1-F29, Fv4-IgG1-F35, Fv4-IgG1-F48, Fv4-IgG1-F93, y Fv4-IgG1-F94). Esto demuestra que a fin de obtener una mayor eficiencia de eliminación de antígeno en comparación con IgG1 humana intacta, la afinidad del anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 debe ser más fuerte que la KD 3,0 micromolar (valor obtenido del ajuste de la curva de Fig. 17). En otras palabras, la afinidad de unión del

anticuerpo a FcRn humano a pH 7,0 debe ser al menos 29 veces mayor que IgG1 humana intacta para obtener una mayor eficiencia de eliminación de antígeno en comparación con IgG1 humana intacta.

En conclusión, el grupo de variantes de anticuerpo que tienen afinidad de unión a FcRn a pH 7,0 entre KD 3,0 micromolar y 0,2 micromolar, o en otras palabras, el grupo de variantes de anticuerpo que tienen afinidad de unión a FcRn a pH 7,0 dentro de un intervalo de 29 veces a 440- veces más fuerte que la IgG1 humana intacta, tienen una farmacocinética de anticuerpos similar a la IgG1 pero tienen una capacidad mejorada para eliminar el anticuerpo del plasma. Por lo tanto, dicho anticuerpo exhibe una eficiencia de eliminación del antígeno mejorada en comparación con IgG1. La farmacocinética similar a la IgG1 permitiría la eliminación a largo plazo del antígeno del plasma (eliminación de antígeno de acción prolongada), y por lo tanto largos intervalos de dosificación que serían preferibles para los agentes terapéuticos de anticuerpos para enfermedades crónicas. El grupo de variantes de anticuerpo que tienen afinidad de unión a FcRn a pH 7,0 más fuerte que KD 0,2 micromolar o, en otras palabras, grupo de variantes de anticuerpo que tienen afinidad de unión a FcRn a pH 7,0 440 veces más fuerte que IgG1 humana intacta, tienen eliminación de anticuerpo rápida (eliminación de anticuerpos a largo plazo). Sin embargo, debido a que dicho anticuerpo permite una eliminación aún más rápida del antígeno (eliminación de antígeno de acción rápida), por lo tanto, dicho anticuerpo también exhibe una eficiencia de eliminación de antígeno mejorada en comparación con IgG1. Como se muestra en el Ejemplo 8, Fv4-IgG1-F20 en ratón normal induciría una eliminación extensa del antígeno del plasma en un plazo muy corto, pero el efecto de eliminación del antígeno no es duradero. Dicho perfil sería preferible para enfermedades agudas en las que se necesita un antígeno relacionado con la enfermedad que se debe reducir del plasma de forma rápida y extensiva en un plazo muy corto

[Ejemplo 10] Estudio in vivo de Fv4-IgG1-F14 mediante el modelo de infusión en estado estacionario usando la línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano

El estudio in vivo de Fv4-IgG1-F14 mediante el modelo de infusión en estado estacionario usando la línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano se realizó como se describió en el Ejemplo 1. El grupo de estudio consiste en el grupo control (sin anticuerpo), Fv4-IgG1 a una dosis de 1 mg/kg y Fv4-IgG1-F14 a una dosis de 1 mg/kg, 0,2 mg/kg, y 0,01 mg/kg.

La Fig. 18 describe el perfil temporal de la concentración plasmática de hsIL-6R después de la administración del anticuerpo. En comparación con el nivel basal de hsIL-6R sin anticuerpo, la administración de 1 mg/kg de Fv4-IgG1 produjo un aumento de varias veces de la concentración plasmática de hsIL-6R. Por otra parte, la administración de 1 mg/kg de Fv4-IgG1-F14 produjo una reducción significativa en la concentración plasmática en comparación con el grupo Fv4-IgG1 y el grupo basal. En el día 2, no se detectó la concentración plasmática de hsIL-6R (el límite de cuantificación de la concentración plasmática de hsIL-6R es de 1,56 ng/mL en este sistema de medición), y esto duró hasta el día 14.

Como se muestra en el Ejemplo 1, H54/L28-IgG1-F14 exhibió una reducción de la concentración plasmática de hsIL-6R en comparación con H54/L28-IgG1, pero el grado de la reducción fue pequeño. El grado de reducción fue mucho mayor para la región variable Fv4 que tiene propiedad de unión dependiente del pH para hsIL-6R. Esto demuestra que aunque el aumento de la afinidad de unión a FcRn humano a pH 7,0 es efectivo para reducir la concentración de antígeno en plasma, la combinación de la unión al antígeno dependiente del pH y el aumento de la afinidad de unión a FcRn humano a pH neutro aumenta significativamente la eliminación del antígeno.

El estudio que usa una dosis más baja de Fv4-IgG1-F14 mostró que incluso a 0,01 mg/kg, 1/100 de 1 mg/kg, redujo la concentración plasmática del antígeno por debajo del valor basal lo que demuestra una eficiencia significativa de la molécula para reducir el antígeno del plasma.

[Ejemplo 11] Comparación de la línea 276 y línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano en el modelo de co-inyección

Se han llevado a cabo estudios previos in vivo usando la línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano (Jackson Laboratories). Con el fin de comparar la diferencia entre la línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano y una línea transgénica diferente, línea 32, se realizó un estudio de co-inyección de H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1 y Fv4-IgG1-v2 usando la línea 32 ratón transgénico que expresa FcRn humano (B6.mFcRn-/-hFCRN Tg32; B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT)32Dcr) (Jackson #4915)), Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104). El procedimiento de estudio era el mismo que el del Ejemplo 3 pero se usó la línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano en lugar de la línea 276 de ratón transgénico que expresa FcRn humano.

La Fig. 19 describe el curso temporal de la concentración de hsIL-6R plasmática en la línea 276 y línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano. H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, y Fv4-IgG1-v2 exhibió un perfil similar de tiempo y concentración de hsIL-6R plasmática. En ambos ratones, el aumento de afinidad de unión al FcRn humano a pH 7,0 mejoró la eliminación de antígeno del plasma (que compara Fv4-IgG1 y Fv4-IgG1-v2) en un mismo grado.

La Fig. 20 describe el curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma en la línea 276 y línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano. H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, y Fv4-IgG1-v2 exhibieron un perfil similar de concentración de anticuerpo en plasma y tiempo.

En conclusión, no se observaron diferencias significativas entre la línea 276 y la línea 32, lo que demuestra que la variante Fc para aumentar la afinidad de unión a FcRn humano a pH 7,0 fue efectiva en dos líneas de ratón transgénicas diferentes que expresan FcRn humano para aumentar la eliminación de la concentración plasmática de antígeno.

[Ejemplo 12] Generación de varias variantes de Fc de anticuerpo que tienen afinidad de unión al FcRn humano a pH neutro

Generación de variantes de Fc

Varias mutaciones para aumentar la afinidad de unión a FcRn humano en el pH neutro se introdujeron en Fv4-IgG1 para mejorar adicionalmente el perfil de eliminación del antígeno. En forma específica, las mutaciones de aminoácidos que se muestran en las Tablas 9-1 a 9-14, se introdujeron en la región constante de la cadena pesada de Fv4-IgG1 para generar variantes de Fc (números de aminoácidos de los sitios de mutación se describen de acuerdo con la numeración EU). Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 1.

Las variantes adicionales (IgG1-F100 a IgG1-F599) que comprenden una cadena pesada y L preparadas (WT) (SEC ID NO: 5) se expresaron y purificaron mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica como se describe en el Ejemplo de referencia 2.

Evaluación de unión a FcRn humano

La unión entre el anticuerpo y FcRn humano se analizó cinéticamente como se describió en el Ejemplo 5 para IgG1-v1, IgG1-v2 y IgG1-F2 a IgG1-F599 o Ejemplo 9 para IgG1 y M73. El resultado sobre la unión a FcRn humano en una condición neutra (pH 7,0) por Biacore se muestra en las Tablas 9-1 a 9-14.

[Tabla 9-1]

NOMBRE DE LA VARIANTE	KD (M)	SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDO
IgG1	8,8E-05	Ninguno
M73	1,4E-05	(WO2009/125825)
IgG1-v1	3,2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8,1E-07	N434W
IgG1-F3	2,5E-06	N434Y
IgG1-F4	5,8E-06	N434S
IgG1-F5	6,8E-06	N434A
IgG1-F7	5,6E-06	M252Y
IgG1-F8	4,2E-06	M252W
IgG1-F9	1,4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6,9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3,1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1,7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3,2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1,8E-07	M252W/N434W

NOMBRE DE LA VARIANTE	KD (M)	SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDO
IgG1-F19	4,6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4,6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3,0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2,0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9,2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1,0E-06	I332V
IgG1-F27	7,4E-06	G237M
IgG1-F29	1,4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2,8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8,0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2,3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2,8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8,4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3,6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1,1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1,0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3,0E-07	M252Y/S254T/N434Y

Tabla 9-2 es la continuación de la Tabla 9-1.

[Tabla 9-2]

IgG1-F40	8,2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1,5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1,0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1,7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1,1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2,4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3,2E-07	M252Y/T256Q/N434Y

IgG1-F49	5,1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1,2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8,1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3,1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1,0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8,4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9,4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1,1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7,7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2,4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1,1E-05	G385H
IgG1-F61	9,7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1,9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2,5E-06	N434F
IgG1-F64	5,3E-06	N434H
IgG1-F65	2,9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4,3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6,3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9,3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5,1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1,5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8,3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2,0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1,7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4,6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1,4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1,0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A

IgG1-F77	9,9E-07	T256E/M428L/N434Y

Tabla 9-3 es la continuación de la Tabla 9-2.

[Tabla 9-3]

IgG1-F78	7,8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5,9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2,7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1,6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1,1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2,6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2,8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5,5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1,5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4,3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1,9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3,6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1,9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4,8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1,1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7,4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3,7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2,6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6,2E-07	M252Y/T256E/N434H
IgG1-F101	1,1E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
IgG1-F103	4,4E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F104	3,7E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
IgG1-F105	7,5E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
IgG1-F106	3,7E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y

IgG1-F107	3,4E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
IgG1-F108	4,1E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
IgG1-F109	3,2E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F111	3,2E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
IgG1-F112	6,4E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
IgG1-F113	3,2E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F114	3,8E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
IgG1-F115	6,6E-06	T307A/N434A
IgG1-F116	8,7E-06	E380A/N434A
IgG1-F118	1,4E-05	M428L
IgG1-F119	5,4E-06	T250Q/M428L

Tabla 9-4 es la continuación de la Tabla 9-3.

[Tabla 9-4]

IgG1-F120	6,3E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F121	1,5E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F122	1,2E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
IgG1-F123	3,0E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
IgG1-F124	2,9E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F125	2,4E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F128	1,7E-07	P257L/M428L/N434W
IgG1-F129	2,2E-07	P257A/M428L/N434Y
IgG1-F131	3,0E-06	P257G/M428L/N434Y
IgG1-F132	2,1E-07	P257I/M428L/N434Y
IgG1-F133	4,1E-07	P257M/M428L/N434Y
IgG1-F134	2,7E-07	P257N/M428L/N434Y
IgG1-F135	7,5E-07	P257S/M428L/N434Y
IgG1-F136	3,8E-07	P257T/M428L/N434Y

IgG1-F137	4,6E-07	P257V/M428L/N434Y
IgG1-F139	1,5E-08	M252W/V308P/N434W
IgG1-F140	3,6E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F141	3,5E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
IgG1-F142	3,7E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F143	2,0E-07	M252Y/V308A/N434Y
IgG1-F145	5,3E-08	M252Y/V308F/N434Y
IgG1-F147	2,4E-07	M252Y/V308T/N434Y
IgG1-F149	1,9E-07	M252Y/V308L/N434Y
IgG1-F150	2,0E-07	M252Y/V308M/N434Y
IgG1-F152	2,7E-07	M252Y/V308Q/N434Y
IgG1-F154	1,8E-07	M252Y/V308T/N434Y
IgG1-F157	1,5E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F158	5,9E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F159	4,4E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F160	8,5E-07	M252W/M428I/N434Y
IgG1-F162	1,7E-07	M252W/M428Y/N434Y
IgG1-F163	3,5E-07	M252W/M428F/N434Y
IgG1-F164	3,7E-07	P238A/M252W/N434Y
IgG1-F165	2,9E-07	M252W/D265A/N434Y
IgG1-F166	1,5E-07	M252W/T307Q/N434Y

Tabla 9-5 es la continuación de la Tabla 9-4.

[Tabla 9-5]

IgG1-F167	2,9E-07	M252W/V303A/N434Y
IgG1-F168	3,2E-07	M252W/D376A/N434Y
IgG1-F169	2,9E-07	M252W/V305A/N434Y
IgG1-F170	1,7E-07	M252W/Q311A/N434Y

IgG1-F171	1,9E-07	M252W/D312A/N434Y
IgG1-F172	2,2E-07	M252W/K317A/N434Y
IgG1-F173	7,7E-07	M252W/E380A/N434Y
IgG1-F174	3,4E-07	M252W/E382A/N434Y
IgG1-F175	2,7E-07	M252W/S424A/N434Y
IgG1-F176	2,9E-07	S239K/M252W/N434Y
IgG1-F177	2,8E-07	M252W/S298G/N434Y
IgG1-F178	2,7E-07	M252W/D270F/N434Y
IgG1-F179	3,1E-07	M252W/N325G/N434Y
IgG1-F182	6,6E-08	P257A/M428L/N434W
IgG1-F183	2,2E-07	P257T/M428L/N434W
IgG1-F184	2,7E-07	P257V/M428L/N434W
IgG1-F185	2,6E-07	M252W/I332V/N434Y
IgG1-F188	3,0E-06	P257I/Q311I
IgG1-F189	1,9E-07	M252Y/T307A/N434Y
IgG1-F190	1,1E-07	M252Y/T307Q/N434Y
IgG1-F191	1,6E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F192	1,1E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F193	8,5E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F194	1,2E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F195	5,6E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F196	3,5E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F197	3,3E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F198	4,8E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F201	2,1E-07	M252Y/T307D/N434Y
IgG1-F203	2,4E-07	M252Y/T307F/N434Y
IgG1-F204	2,1E-07	M252Y/T307G/N434Y

IgG1-F205	2,0E-07	M252Y/T307H/N434Y
IgG1-F206	2,3E-07	M252Y/T307I/N434Y
IgG1-F207	9,4E-07	M252Y/T307K/N434Y
IgG1-F208	3,9E-07	M252Y/T307L/N434Y

Tabla 9-6 es la continuación de la Tabla 9-5.

[Tabla 9-6]

IgG1-F209	1,3E-07	M252Y/T307M/N434Y
IgG1-F210	2,9E-07	M252Y/T307N/N434Y
IgG1-F211	2,4E-07	M252Y/T307P/N434Y
IgG1-F212	6,8E-07	M252Y/T307R/N434Y
IgG1-F213	2,3E-07	M252Y/T307S/N434Y
IgG1-F214	1,7E-07	M252Y/T307V/N434Y
IgG1-F215	9,6E-08	M252Y/T307W/N434Y
IgG1-F216	2,3E-07	M252Y/T307Y/N434Y
IgG1-F217	2,3E-07	M252Y/K334L/N434Y
IgG1-F218	2,6E-07	M252Y/G385H/N434Y
IgG1-F219	2,5E-07	M252Y/T289H/N434Y
IgG1-F220	2,5E-07	M252Y/Q311H/N434Y
IgG1-F221	3,1E-07	M252Y/D312H/N434Y
IgG1-F222	3,4E-07	M252Y/N315H/N434Y
IgG1-F223	2,7E-07	M252Y/K360H/N434Y
IgG1-F225	1,5E-06	M252Y/L314R/N434Y
IgG1-F226	5,4E-07	M252Y/L314K/N434Y
IgG1-F227	1,2E-07	M252Y/N286E/N434Y
IgG1-F228	2,3E-07	M252Y/L309E/N434Y
IgG1-F229	5,1E-07	M252Y/R255E/N434Y
IgG1-F230	2,5E-07	M252Y/P387E/N434Y

IgG1-F236	8,9E-07	K248I/M428L/N434Y
IgG1-F237	2,3E-07	M252Y/M428A/N434Y
IgG1-F238	7,4E-07	M252Y/M428D/N434Y
IgG1-F240	7,2E-07	M252Y/M428F/N434Y
IgG1-F241	1,5E-06	M252Y/M428G/N434Y
IgG1-F242	8,5E-07	M252Y/M428H/N434Y
IgG1-F243	1,8E-07	M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F244	1,3E-06	M252Y/M428K/N434Y
IgG1-F245	4,7E-07	M252Y/M428N/N434Y
IgG1-F246	1,1E-06	M252Y/M428P/N434Y
IgG1-F247	4,4E-07	M252Y/M428Q/N434Y
IgG1-F249	6,4E-07	M252Y/M428S/N434Y
IgG1-F250	2,9E-07	M252Y/M428T/N434Y
IgG1-F251	1,9E-07	M252Y/M428V/N434Y

Tabla 9-7 es la continuación de la Tabla 9-6.

[Tabla 9-7]

IgG1-F252	1,0E-06	M252Y/M428W/N434Y
IgG1-F253	7,1E-07	M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F254	7,5E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F255	1,1E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F256	5,4E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F257	5,0E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
IgG1-F258	3,2E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F259	2,8E-07	M252Y/D270F/N434Y
IgG1-F260	1,3E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
IgG1-F261	8,4E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F262	1,9E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y

IgG1-F263	1,1E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
IgG1-F264	2,8E-07	M252Y/E382A/N434Y
IgG1-F265	6,8E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F266	4,7E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F267	3,2E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F268	6,3E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
IgG1-F269	5,2E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
IgG1-F270	6,6E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
IgG1-F271	6,9E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
IgG1-F272	6,8E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
IgG1-F273	6,5E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F274	7,6E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F275	4,2E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F276	4,1E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F277	1,3E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F278	3,0E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F279	6,1E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
IgG1-F280	4,1E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F281	9,2E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F282	2,9E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F283	1,0E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F284	1,0E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F285	9,9E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F286	1,2E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y

Tabla 9-8 es la continuación de la Tabla 9-7.

[Tabla 9-8]

IgG1-F287	1,0E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F288	1,9E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
IgG1-F289	4,8E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
IgG1-F290	4,6E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F292	2,0E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F293	5,3E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F294	1,1E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F295	6,8E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F296	4,9E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F297	5,1E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F298	4,8E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F299	9,4E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F300	8,3E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F301	7,2E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F302	1,9E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
IgG1-F303	6,7E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F304	1,6E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F305	2,7E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F306	3,6E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F307	3,6E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F308	1,8E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F310	9,4E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F311	2,9E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F312	4,5E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F313	6,5E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F314	3,2E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y

IgG1-F315	6,8E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F316	7,0E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
IgG1-F317	1,1E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F318	1,8E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F320	2,0E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F321	3,2E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
IgG1-F322	9,2E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
IgG1-F323	2,7E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F324	2,8E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y

Tabla 9-9 es la continuación de la Tabla 9-8.

[Tabla 9-9]

IgG1-F325	2,1E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F326	7,5E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F327	6,5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F328	1,9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F329	1,2E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F330	3,6E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
IgG1-F331	3,0E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
IgG1-F333	7,4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
IgG1-F334	1,9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
IgG1-F335	1,5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M4281/N434Y
IgG1-F336	1,4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F337	5,6E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F338	7,7E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F339	1,9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
IgG1-F343	3,2E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F344	3,0E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y

IgG1-F349	1,5E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F350	1,7E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F352	6,0E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F353	1,1E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F354	2,8E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F356	3,4E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
IgG1-F357	1,6E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
IgG1-F358	1,0E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
IgG1-F359	4,2E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
IgG1-F360	1,3E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F362	5,4E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F363	4,1E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F364	3,5E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F365	5,1E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F367	1,5E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F368	2,0E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F369	7,5E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
IgG1-F372	1,3E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F373	1,1E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y

Tabla 9-10 es la continuación de la Tabla 9-9.

[Tabla 9-10]

IgG1-F374	1,2E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F375	5,5E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F376	9,5E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F377	1,3E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F379	1,0E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F380	5,6E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y

IgG1-F381	1,1E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F382	8,7E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F386	3,2E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
IgG1-F387	1,5E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
IgG1-F388	7,0E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
IgG1-F389	1,7E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
IgG1-F390	6,8E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
IgG1-F391	3,6E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
IgG1-F392	6,9E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F393	1,2E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F394	5,3E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F395	2,4E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
IgG1-F396	2,0E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F397	4,5E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
IgG1-F398	4,4E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N4 34Y
IgG1-F399	6,5E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F400	6,1E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F401	6,9E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
IgG1-F402	2,3E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W
IgG1-F403	5,1E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
IgG1-F404	9,4E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F405	1,7E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F406	1,5E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F407	1,6E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F408	2,5E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
IgG1-F409	2,0E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F410	2,2E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y

IgG1-F411	1,3E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y

Tabla 9-11 es la continuación de la Tabla 9-10.

[Tabla 9-11]

IgG1-F412	8,8E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
IgG1-F413	1,2E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
IgG1-F414	1,1E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
IgG1-F415	5,6E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F416	9,4E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F418	6,2E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F419	1,6E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
IgG1-F420	1,5E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
IgG1-F421	1,3E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
IgG1-F422	1,8E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
IgG1-F423	8,4E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
IgG1-F424	9,4E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F425	8,0E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
IgG1-F426	8,4E-08	P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F427	1,1E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F428	8,0E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F429	3,7E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F430	8,1E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F431	6,5E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F432	9,2E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
IgG1-F433	6,0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
IgG1-F434	2,0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F435	2,5E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
IgG1-F436	2,5E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y

IgG1-F437	5,7E-08	P257A/T307Q/N434Y
IgG1-F438	3,6E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F439	4,0E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F440	1,5E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F441	1,8E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F442	2,0E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F443	5,5E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F444	1,4E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F445	6,2E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F446	1,1E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F447	1,4E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y

Tabla 9-12 es la continuación de la Tabla 9-11.

[Tabla 9-12]

IgG1-F448	5,3E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F449	5,7E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F450	5,2E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F451	1,0E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F452	1,4E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F453	7,8E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F454	9,6E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F455	2,5E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F456	3,4E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F457	4,0E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F458	1,5E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F459	1,3E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F460	4,7E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F462	8,5E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y

IgG1-F463	1,3E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F464	5,5E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F465	2,1E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F466	3,5E-07	T256E/P257V/N434Y
IgG1-F467	5,7E-07	T256E/P257T/N434Y
IgG1-F468	5,7E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F469	5,6E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F470	5,4E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F471	6,6E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F472	5,4E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F473	4,5E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F474	3,5E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F475	4,3E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F476	5,5E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F477	4,3E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F480	3,9E-08	P257L/V308P/N434Y
IgG1-F481	5,6E-08	P257T/T307Q/N434Y
IgG1-F482	7,0E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
IgG1-F483	5,7E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F484	6,2E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
IgG1-F485	9,7E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y

Tabla 9-13 es la continuación de la Tabla 9-12.

[Tabla 9-13]

IgG1-F486	3,4E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F488	3,5E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F490	7,5E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F492	9,8E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y

IgG1-F493	4,9E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F497	3,1E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
IgG1-F498	1,3E-06	P257A/M428V/N434Y
IgG1-F499	5,2E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
IgG1-F500	4,3E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F506	1,9E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F507	5,1E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F508	1,1E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
IgG1-F509	5,8E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
IgG1-F510	5,3E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
IgG1-F511	4,2E-07	P257V/N434Y
IgG1-F512	5,8E-07	P257T/N434Y
IgG1-F517	3,1E-07	P257V/N286E/N434Y
IgG1-F518	4,2E-07	P257T/N286E/N434Y
IgG1-F519	2,6E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
IgG1-F521	1,1E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F523	2,6E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F526	1,9E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F527	9,4E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F529	2,5E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F533	1,2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F534	1,2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F535	3,9E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F538	9,9E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F541	6,0E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F544	3,1E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F549	5,4E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y

IgG1-F550	5,9E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F551	1,2E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F552	1,1E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F553	1,7E-07	M252Y/Q311A/N434Y

Tabla 9-14 es la continuación de la Tabla 9-13.

[Tabla 9-14]

IgG1-F554	2,8E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F556	1,5E-06	M252Y/T307Q/Q311A
IgG1-F559	8,0E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
IgG1-F560	2,8E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F561	1,4E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
IgG1-F562	8,3E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
IgG1-F563	1,3E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
IgG1-F564	1,9E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
IgG1-F565	9,2E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
IgG1-F566	6,1E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F567	2,2E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
IgG1-F568	1,1E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F569	2,0E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F570	1,3E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F571	8,1E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F572	1,0E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
IgG1-F576	1,6E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
IgG1-F577	1,3E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
IgG1-F578	5,7E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
IgG1-F580	8,6E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
IgG1-F581	7,2E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y

IgG1-F582	7,5E-07	S239K/M252Y/V308P
IgG1-F583	7,8E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
IgG1-F584	6,3E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
IgG1-F585	2,9E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
IgG1-F586	1,4E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
IgG1-F587	1,9E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
IgG1-F592	2,0E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
IgG1-F593	3,1E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F595	1,8E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F596	4,0E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F597	2,2E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
IgG1-F598	1,4E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
IgG1-F599	5,2E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y

[Ejemplo 13] Estudio in vivo de varias variantes Fc de anticuerpos por el modelo de infusión en estado estacionario usando la línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano

Las variantes Fc generadas en el Ejemplo 12 se analizaron en cuanto a su capacidad para eliminar el antígeno del plasma en el modelo de infusión en estado estacionario usando la línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano. Se realizó el estudio in vivo de modelo de infusión en estado estacionario como se describe en el Ejemplo 1, pero se usó la línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano en lugar de la línea 276 y se inyectó dos veces el anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón (antes de la implantación de la bomba y 14 días después de la inyección del anticuerpo) o tres veces (antes de la implantación de la bomba y 10 y 20 días después de la inyección del anticuerpo).

A partir de las variantes Fc descritas en las Tablas 9-1 a 9-14, las variantes de Fc de anticuerpo seleccionadas que se enumeran a continuación se expresaron y purificaron mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica como se describe en el Ejemplo de referencia 2:

Fv4-IgG1 que comprende VH3-IgG1 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F11 que comprende VH3-IgG1-F11 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F14 que comprende VH3-IgG1-F14 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F39 que comprende VH3-IgG1-F39 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F48 que comprende VH3-IgG1-F48 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F140 que comprende VH3-IgG1-F140 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F157 que comprende VH3-IgG1-F157 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F194 que comprende VH3-IgG1-F194 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F196 que comprende VH3-IgG1-F196 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F198 que comprende VH3-IgG1-F198 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F262 que comprende VH3-IgG1-F262 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F264 que comprende VH3-IgG1-F264 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F393 que comprende VH3-IgG1-F393 y VL3-CK;

Fv4-IgG1-F424 que comprende VH3-IgG1-F434 y VL3-CK; y

Fv4-IgG1-F447 que comprende VH3-IgG1-F447 y VL3-CK.

Estos anticuerpos se administraron a la línea 32 de ratón transgénico que expresa FcRn humano a una dosis de 1 mg/kg.

La Fig. 21 describe el curso temporal de concentración de hsIL-6R plasmática de hsIL-6R en el ratón. En comparación con Fv4-IgG1, todas las variantes de Fc que tenían afinidad de unión aumentada a FcRn humano a pH 7,0 exhibían una reducción de la concentración plasmática de hsIL-6R, por lo tanto, una mejor eliminación de antígeno del plasma. Aunque la extensión y durabilidad de la reducción de la concentración de antígeno fue diferente entre las variantes Fc, todas las variantes redujeron consistentemente la concentración e hsIL-6R plasmática en comparación con IgG1 lo que demuestra que el aumento de la afinidad de unión a FcRn humano a pH 7,0 aumentaría universalmente la eliminación de antígeno del plasma. La Fig. 22 curso temporal de la concentración de anticuerpo en plasma en el ratón. La farmacocinética de anticuerpos fue diferente entre las variantes Fc.

Como se describe en el Ejemplo 9, la cantidad de antígeno eliminado del plasma por anticuerpo es el factor importante para evaluar la eficiencia de la eliminación del antígeno mediante la administración de las variantes de anticuerpo Fc que tienen afinidad de unión aumentada a FcRn humano a pH 7,0. Por lo tanto, los cursos de tiempo del valor C (relación molar antígeno/anticuerpo) para cada anticuerpo se describieron en la Fig. 23. La Fig. 24 describe la relación entre la afinidad de unión de las variantes Fc a FcRn humano a pH 7,0 y el valor C (relación molar antígeno/anticuerpo) en el día 1 después de la administración de anticuerpos. Esto demuestra que todas las variantes de anticuerpo Fc analizadas en este estudio tienen un valor C más bajo en comparación con Fv4-IgG1. Debido a que todas las variantes Fc analizadas en este estudio tienen afinidad de unión a FcRn humano a pH 7,0 más fuerte que KD 3,0 micromolar, lograron mayor eficiencia de eliminación de antígeno en comparación con IgG1 humana intacta. Esto era concordante con los resultados obtenidos en el Ejemplo 9 (Figura 17).

La Fig. 25 describe que entre las variantes Fc analizadas en este estudio, los anticuerpos que tenían la variante Fc de F11, F39, F48 y F264 presentaban una farmacocinética similar a IgG1. Debido a que este estudio se lleva a cabo usando ratón transgénico que expresa FcRn humano, se espera que estas variantes de Fc tengan vida media larga similar a IgG1 también en seres humanos. La Fig. 26 describe el curso temporal de la concentración plasmática de hsIL-6R en ratones inyectados con anticuerpos que tienen farmacocinética similar a IgG1 humana intacta (F11, F39, F48 y F264). Estas variantes redujeron la concentración plasmática de hsIL-6R en comparación con IgG1 aproximadamente 10 veces. Además, estos anticuerpos redujeron la concentración de hsIL-6R por debajo de la concentración basal de hsIL-6R (concentración sin anticuerpo). Por lo tanto, estos anticuerpos pueden permitir la eliminación a largo plazo del antígeno del plasma y, por tanto, intervalos de dosificación largos que serían preferibles para los agentes terapéuticos de anticuerpos para enfermedades crónicas.

La Fig. 27 y 28 describieron el curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma y la concentración de hsIL-6R plasmática para IgG1, y variante de Fct F157, F196 y F262, respectivamente. Sorprendentemente, aunque la farmacocinética de anticuerpos de F157 y F262 mostró una eliminación significativamente más rápida de plasma en comparación con IgG1 humana intacta, F157 y F262 exhibieron una eliminación muy extensa y duradera de hsIL-6R del plasma. En forma específica, la concentración de hsIL-6R plasmática de F157 estaba por debajo del límite de detección (1,56 ng/mL), desde los días 1 a 28 (excepto en el día 14) y la de F262 estaba por debajo del límite de detección (1,56 ng/ml) desde los días 14 hasta 28. Por otra parte, para F196 con una eliminación más lenta del anticuerpo en comparación con F157, la concentración de antígeno comenzó a aumentar al día 14 y retornó al valor basal al día 28. Entre las variantes Fc analizadas en este estudio, F157 y F262 fueron las únicas variantes de Fc que eran capaces de reducir la concentración de hsIL-6R plasmática por debajo de 1,56 ng/ml al día 28.

Tal efecto duradero a largo plazo de F157 y F262 es inesperado de la farmacocinética del anticuerpo, ya que los anticuerpos se eliminaron del plasma muy rápidamente en comparación con la IgG1 humana intacta. En particular, la concentración plasmática de anticuerpos de F157 no se detectó al día 21. Sin embargo, la concentración de hsIL-6R plasmática se continuó reduciendo a un nivel inferior al límite de detección de 1,56 ng/ml a los días 21 y 28. Este efecto inesperado se considera debido a la presencia del anticuerpo en la superficie de la célula del endotelio vascular como forma unida a FcRn. Aunque estos anticuerpos mostraron baja concentración en el plasma, estos anticuerpos están todavía presentes en el compartimiento vascular como forma ligada a FcRn (que no se puede medir como concentración de anticuerpo en plasma). Estos anticuerpos unidos a FcRn aún se pueden unir al antígeno en el plasma, y después de la captación mediada por FcRn del complejo antígeno/anticuerpo, el antígeno se libera dentro del endosoma y se degrada mediante el lisosoma mientras que el anticuerpo se recicla de vuelta a la superficie celular como forma ligada a FcRn . Por tanto, estos anticuerpos unidos a FcRn contribuyen a la eliminación del antígeno. Esto explica la razón por la que estos anticuerpos mantienen la capacidad de eliminación de antígenos incluso después de que la concentración de anticuerpo baje en el plasma.

[Ejemplo 14] Estudio in silico comparativo de anticuerpo convencional y anticuerpo eliminador de antígeno

El Ejemplo 13 demuestra que el anticuerpo con la unión dependiente del pH al antígeno y aumento de afinidad de unión a FcRn humano a pH neutro es capaz de eliminar el antígeno del plasma. Por lo tanto, tales anticuerpos eliminador de antígeno son útiles para el anticuerpo dirigido al antígeno en el que la unión y neutralización simples no son suficientes para tratar la enfermedad, y se requiere la reducción del antígeno del plasma.

Los anticuerpos eliminadores de antígeno son también útiles para el anticuerpo dirigido al antígeno donde la unión y neutralización simple son suficientes. La unión de anticuerpos y la neutralización del antígeno requiere al menos la misma cantidad molar de anticuerpo a medida que el antígeno en el plasma (si el anticuerpo tiene afinidad infinita al antígeno, el antígeno se puede neutralizar por la misma cantidad molar de anticuerpo que el antígeno). En contraste con el anticuerpo convencional (anticuerpo sin unión al antígeno dependiente del pH y manipulación genética de a Fc), los anticuerpos eliminador de antígeno pueden reducir la concentración de antígeno en el plasma. Esto significa que la concentración de anticuerpos necesaria para neutralizar el antígeno se puede reducir. Si el anticuerpo eliminador de antígenos redujo la concentración de antígeno en plasma 10 veces en comparación con el anticuerpo convencional, la concentración de anticuerpos necesaria para neutralizar el antígeno también se puede reducir en 10 veces. Por lo tanto, en un escenario terapéutico, el anticuerpo eliminador de antígenos puede reducir la dosificación del anticuerpo o aumentar el intervalo de dosificación en comparación con el anticuerpo convencional.

Las variantes Fc tales como F11, F39, F48 y F264 son capaces de reducir la concentración de antígeno en plasma en comparación con IgG1 aproximadamente 10 veces. Con el fin de evaluar el efecto de tales anticuerpos que eliminan antígenos en comparación con el anticuerpo convencional, se realizó una evaluación in silico de la dosis de anticuerpos requerida para mantener la neutralización de antígenos en un escenario terapéutico tanto para el anticuerpo convencional como para el anticuerpo eliminador de antígeno. Los autotes han determinado una dosis requerida para mantener la neutralización por cada intervalo de dosificación de 3 meses (es decir, la dosis requerida para Q3M).

Construcción del modelo farmacocinético

Se construyó el modelo farmacocinético (PK) usando el software de análisis PK SAAM II (The SAAM Institute, Inc.). El modelo de PK se construye como se describe en Pharmacokinet Pharmacodyn. Diciembre de 2001; 28 (6): 507 - 32 y Br J Clin Pharmacol. 2007 mayo; 63 (5): 548 - 61. El concepto del modelo PK se muestra en la Fig. 29. La cantidad de cada compartimiento se describió mediante las siguientes ecuaciones diferenciales.

[Math.1]

$$\frac{dXsc}{dt} = -ka \times Xsc$$

$$\frac{dXmab}{dt} = ka \times Xsc - CLmab \times \frac{Xmab}{Vmab} - kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} + koff \times Xcom + \left(\frac{CLcom}{Vcom} - \frac{CLmab}{Vmab} \right) \times Xcom$$

$$\frac{dXcom}{dt} = -CLcom \times \frac{Xcom}{Vcom} + kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} - koff \times Xcom$$

$$\frac{dXag}{dt} = -CLag \times \frac{Xag}{Vag} - kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} + koff \times Xcom + R$$

Xsc: la cantidad de anticuerpo en tejido subcutáneo

Xmab: la cantidad de free anticuerpo en suero

Xcom: la cantidad de complejo inmune del anticuerpo y antígeno (=complejo)

Xag: la cantidad de antígeno libre en suero

ka: constante de la velocidad de absorción

En este modelo se supone que la biodisponibilidad (F) es de 1 para todos los anticuerpos, y la velocidad de biosíntesis del antígeno (R) se establece mediante la siguiente ecuación.

[Math.2]

$$R = CLag \times Cpre$$

Cpre: concentración de antígeno en estado estacionario en suero.

Los parámetros farmacocinéticos y los parámetros cinéticos de unión al antígeno utilizados en este estudio in silico se describen en la Tabla 10.

[Tabla 10]

CLmab	L/día/kg	0,0025
CLag	L/día/kg	0,0243
CLcom	L/día/kg	0,0045
Vmab=Vag	L/kg	0,0843
Vcom	L/kg	0,0519
ka	1/día	0,4800
koff	1/día	53,0496
kon	1/nM/día	53,0496
	L/ug/día	0,353664

Simulación para calcular el efecto del anticuerpo eliminador de antígeno y maduración de afinidad

La concentración en estado estacionario (Cpre) antes de la administración del anticuerpo se ajustó a 2,400 ng/mL. Con el modelo de PK construido, se estimó la dosis mínima de anticuerpo con el fin de mantener la concentración de antígeno libre por debajo de 35 ng/mL 84 días después de la administración subcutánea individual. El peso molecular del antígeno se fija en 190 kDa, y el peso molecular de los anticuerpos terapéuticos se fija como 150 kDa.

Como anticuerpo, se usaron anticuerpo convencional y anticuerpo eliminador de antígeno con diversas afinidades de unión (diferente grado de maduración por afinidad del anticuerpo original con KD 1 nM) en este estudio in silico. El efecto del anticuerpo eliminador de antígeno se refleja como la eliminación más rápida del complejo antígeno-anticuerpo que el anticuerpo convencional. El parámetro de eliminación del complejo antígeno-anticuerpo (CLcom) se describe en la Tabla 11.

[Tabla 11]

		Ab convencional	Ab eliminador de Ag
CLcom	L/día/kg	0,0045	0,0729

También se considera el efecto de la maduración por afinidad del anticuerpo original con KD de 1 nM (la afinidad varía en un intervalo de 100 veces). Se usan KD de 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM y 10 pM en este estudio in silico. El efecto de la maduración de afinidad se refleja como disminución de koff. Los valores de koff se varían en un intervalo de 100 veces (koff = 53,05, 17,68, 5,30, 1,77, 0,53 [1/día].

Se obtuvo la dosis de anticuerpo por cuerpo con el fin de mantener la concentración de antígeno libre por debajo de 35 ng/mL 84 días después de la administración subcutánea única para el anticuerpo convencional y anticuerpo eliminador de antígeno con afinidad de unión (KD) de 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 PM y 10 pM. El resultado se describió en la Tabla 12.

[Tabla 12]

Dosis (mg/cuerpo)	1 nM	333pM	100pM	33pM	10pM
Ab convencional	2868	1256	692	532	475
Ab eliminador de antígeno	180	81	46	36	33

El anticuerpo convencional original con afinidad de unión de 1 nM requiere 2,868 mg para lograr la dosificación de Q3M. Aunque la dosificación de anticuerpos se puede reducir mediante la mejora de la afinidad de unión al antígeno, la reducción de la dosificación alcanza un techo. Este techo se deriva del hecho de que la unión a anticuerpos y la neutralización del antígeno requieren al menos la misma cantidad molar de anticuerpo que el antígeno en el plasma. Incluso con una afinidad de unión de 10 pM, el anticuerpo convencional requiere 475 mg para conseguir la dosis de Q3M, que es una dosis que no se puede ser inyectar subcutáneamente por inyección única debido a la limitación de la concentración de anticuerpos de formulación y volumen inyectable por vía subcutánea.

Por otra parte, mediante la manipulación genética de anticuerpos convencionales en anticuerpo eliminador de antígeno mediante la manipulación genética de la dependencia del pH en la unión de antígeno (o mediante la generación directa de anticuerpos con unión dependiente de pH) y manipulación genética de la región Fc para tener mayor afinidad de unión a FcRn a pH neutro, se puede reducir significativamente la dosis de anticuerpo. El anticuerpo eliminador de antígeno con afinidad de unión de 1 nM requiere son 180 mg para lograr la dosificación de Q3M. Este nivel de dosis no se puede conseguir mediante anticuerpos convencionales incluso con afinidad infinita. Mediante la mejora de la afinidad de unión del anticuerpo eliminador de antígeno a 10 pM, se puede reducir la dosis a 33 mg, que es una dosis que se puede inyectar fácilmente por vía subcutánea.

Por tanto, este estudio in silico demostró que el anticuerpo eliminador de antígenos tiene una ventaja significativa sobre el anticuerpo convencional. La dosis del anticuerpo se puede reducir a un nivel en el que el anticuerpo convencional es incapaz de alcanzar incluso con afinidad infinita. Con respecto al intervalo de dosificación, cuando el anticuerpo eliminador de antígeno se inyecta a la misma dosis que el anticuerpo convencional, el anticuerpo eliminador de antígeno puede tener un efecto más sostenido, por lo tanto permite un intervalo de dosificación significativamente más largo. Tanto la reducción de la dosis como la prolongación del intervalo de dosis mediante el anticuerpo eliminador de antígeno puede proporcionar una ventaja significativa sobre el anticuerpo convencional.

Cabe señalar que, como se describe en el Ejemplo 1, el anticuerpo eliminador de antígeno no requiere necesariamente una unión al antígeno dependiente del pH. La unión al antígeno dependiente del pH puede aumentar significativamente la actividad de eliminación del antígeno del anticuerpo. Además, la propiedad de unión dependiente del pH se puede sustituir usando otros factores cuya concentración sea diferente dentro del plasma y del endosoma. Este factor también se puede usar para generar un anticuerpo que se une al antígeno dentro del plasma pero se disocia el antígeno dentro del endosoma.

Ejemplo 15 Estudio sobre la potenciación del efecto acelerador de la eliminación de IL-6 humana de anticuerpos anti-IL-6 humanos dependientes del pH

[Ejemplo 15] Estudio sobre la mejora del efecto de aceleración de la eliminación de IL-6 humana de anticuerpos anti-IL-6 humana dependientes de pH

Generación de anticuerpo de unión a IL-6 humana dependiente del pH

CLB8-IgG1 que comprende CLB8H-IgG1 (SEC ID NO: 16) y CLB8L-CK (SEC ID NO: 17) que se describe en el documento 2009/125825 es un anticuerpo anti-IL-6 quimérico. H16/L13-IgG1 que comprende H16-IgG1 (SEC ID NO: 18) y L13-CK (SEC ID NO: 19) es un anticuerpo anti-IL-6 quimérico que resulta de conferir CLB8-IgG1 con la propiedad para unirse a IL-6 humana de una manera dependiente del pH (que se une a pH 7,4 pero se disocia a pH 5,8).

Evaluación de actividad de unión dependiente de pH del anticuerpo anti-IL-6 quimérico para IL-6 humana

CLB8-IgG1 y H16/L13-IgG1 se evaluaron para la actividad de unión a IL-6 humana (constante de disociación (KD)) a pH 5,5 ya pH 7,4 usando Biacore T100 (GE Healthcare). El ensayo se llevó a cabo usando 10 mMol de ACES/150 mmol/l de NaCl que contiene tensioactivo P20 0,05% (pH 7,4 y pH 6,0) como tampón de corrida. Después de que los anticuerpos se unieron a la proteína A/G recombinante (Thermo Scientific) inmovilizada en chips de sensor usando un procedimiento de acoplamiento amino, se inyectaron concentraciones apropiadas de IL-6 humana (TORAY) como analito. Los ensayos se realizaron a 37 ° C. Los resultados del ensayo se analizaron usando el Software de Evaluación Biacore T100 (GE Healthcare) y la constante de velocidad de asociación ka (1/Ms), y la constante de velocidad de disociación kd (1/s) Se calcularon a partir de los resultados del ensayo. A continuación, la KD (M) se calculó a partir de ka y kd (Tabla 13]. Además, se evaluó la unión dependiente del pH para calcular la relación de KD entre pH 7,4 y pH 6,0 para cada anticuerpo.

[Tabla 13]

muestra	pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD(pH5,5)/KD(pH7,4)
CLB8-IgG1	pH7,4	3,6E+06	8,0E-04	2,2E-10	0,8
	pH5,5	3,7E+06	6,6E-04	1,8E-10	
H16/L13-IgG1	pH7,4	2,1E+06	4,6E-03	2,2E-09	7,4
	pH5,5	3,7E+05	5,9E-03	1,6E-08	

Preparación de anticuerpos anti-IL-6 humana dependientes del pH que tienen actividad de unión a FcRn en condiciones neutras

Se introdujeron mutaciones en H16/L13-IgG1 que comprende H16-IgG1 (SEC ID NO: 18) y L13-CK (SEC ID NO: 19) para aumentar la unión a FcRn en una condición neutra (pH 7,4). En forma específica, H16-IgG1-v2 (SEC ID NO: 20) se preparó a partir de la región constante de la cadena pesada de IgG1 mediante la sustitución de Asn por Trp en la posición 434 en la numeración EU, mientras que H16-F14 (SEC ID NO: 21) se construyó a partir de la región constante de la cadena pesada de IgG1 mediante la sustitución de Met por Tyr en la posición 252, y Asnpor Trp en la posición 434 en la numeración EU. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 1.

CLB8-IgG1 que comprende CLB8H-IgG1 (SEC ID NO: 16) y CLB8L-CK (SEC ID NO: 17), H16/L13-IgG1 que comprende H16-IgG1 (SEC ID NO: 18) y L13-CK (SEC ID NO: 19), H16/L13-IgG1-v2 que comprende H16-IgG1-v2 (SEC ID NO: 20) y L13-CK (SEC ID NO: 19), y H16/L13-F14 que comprende H16-F14 (SEC ID NO: 21) y L13-CK (SEC ID NO: 19) se expresaron y purificaron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 2.

Evaluación de actividad de unión a FcRn de ratón de las variantes de Fc a pH neutro

VH3/L (WT)-IgG1 que comprende VH3-IgG1 y L (WT), VH3/L (WT)-IgG1-v2 que comprende VH3-IgG1-v2 y L (WT), y VH3/L (WT)-IgG1-F14 que comprende VH3-IgG1-F14 y L (WT), todos los cuales se prepararon como se describió en el Ejemplo 5, se evaluaron para determinar la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) por el procedimiento descrito en el ejemplo 8.

El resultado se mostró en la Tabla 14. IgG1 exhibió actividad de unión muy débil mientras que IgG1-v2 e IgG1-F14 exhibió afinidad de unión más fuerte a FcRn de ratón a pH7,4.

[Tabla 14]

	KD
IgG1	ND
IgG1-v2	1,0E-06
IgG1-F14	1,3E-07

Prueba in vivo usando ratones normales

La cinética in vivo de la IL-6 humana (hIL-6, TORAY) y el anticuerpo anti-IL-6 humano se evaluó después de administrar hIL-6 solo o hIL-6 y anticuerpo anti-IL-6 humana en ratones normales (C57BL/6J ratón;, Charles River, Japón). Una solución de hIL-6 (5 microgramos/ml) o una solución de mezcla que contiene hIL-6 y anticuerpo anti-IL-6 humana (grupo CLB8-IgG1; 5 microgramos/ml de hIL-6 y 0,025 mg/ml de CLB8-IgG1, grupo H16/L13-IgG1, H16/L13-IgG1-v2 y H16/L13-IgG1-F14; 5 microgramos/ml de hIL-6 y 0,14 mg/mL de H16/L13-IgG1, H16/L13-IgG1-v2 y H16/L13-IgG1-F14 respectivamente) se administró una vez a una dosis de 10 ml/kg en la vena caudal. La dosis de anticuerpo se fijó de modo que más de 99,8% de IL-6 humana se unió al anticuerpo en la solución de administración. La sangre se recogió a los 5 minutos, 30 minutos, dos horas, cuatro horas, siete horas, un día después de la administración de hIL-6 sola, y 5 minutos, siete horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, siete

días, 14 días, 21 días y 30 días después de la administración de hIL-6 y de la mezcla de la solución de anticuerpo anti-IL-6 humana. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15,000 rpm y 4 grados C durante 15 minutos para separar el plasma. El plasma separado se almacenó en un refrigerador a -20 grados C o menos antes del ensayo.

Medición de concentración plasmática de IL-6 humana por ELISA

La concentración de IL-6 humana en plasma de ratón se midió usando el kit ELISA de IL-6 humana Quantikine HS (R & D). Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0,3125 ng/ml y muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Con el fin de hacer que toda la IL-6 humana en la muestra se una a CLB8-IgG1, se añadieron 150 microlitros de 5 microgramos/ml de CLB8-IgG1 a 150 microlitros de las muestras de la curva de calibración y las muestras de plasma, y luego las muestras se dejaron reposar una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se dispensaron las muestras en las placas proporcionadas en el kit ELISA (R & D), y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el conjugado de IL-6 proporcionado en el kit de ELISA (R & D) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente y se añadió la solución de sustrato proporcionada en el kit ELISA (R & D) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción cromogénica para reaccionar durante media hora a temperatura ambiente usando Solución amplificadora proporcionada en el Kit ELISA (R & D) como sustrato. Después de detener la reacción con solución de detención proporcionada en el kit ELISA (R & D), la absorbancia a 490 nm se midió mediante un lector de microplacas. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración plasmática de hIL-6 después de la administración intravenosa, medida por este procedimiento, se muestra en la Fig. 30 para ratones normales.

Medición de concentración plasmática del anticuerpo anti-IL-6 humana por ELISA

La concentración de anticuerpo anti-IL-6 humana en plasma de ratón se midió mediante ELISA. Se dispensó un fragmento de anticuerpo F(ab')2 anti-IgG humana (específica de cadena gamma) (Sigma) sobre una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 grados C para preparar placas con anticuerpos anti-IgG inmovilizados. Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05 y 0,025 microgramos/ml y muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Con el fin de hacer que todos los anticuerpos anti-IL-6 humana en la muestra se unan a IL-6 humana, se añadieron 200 microlitros de 1 microgramo/ml de IL-6 humana a 100 microlitros de las muestras de la curva de calibración y muestras de plasma, luego las muestras se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se dispensaron en las placas con anti-IgG humana inmovilizada, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió conjugado de anti-IgG humana de cabra (específica de cadena gamma) y biotina (BIOT) (Southern Biotech Association) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente, y la reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato de micropocillo TMP un componente HRP (BioFX Laboratories) como sustrato. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices), El curso temporal de concentración de anticuerpo en plasma después de la administración intravenosa que se mide por este procedimiento se muestra en la Fig. 31 para ratones normales.

Efecto de la unión dependiente de pH a IL-6 humana

CLB8-IgG1 y H16/L13-IgG1 que se unen a IL-6 humana de una manera dependiente del pH se analizaron in vivo, y los resultados se compararon entre ellos. Como se muestra en la Fig. 31, la farmacocinética de anticuerpo presentó una eliminación lineal. Entretanto, como se muestra en la Fig. 30, se halló que hIL-6 administrada simultáneamente con H16/L13-IgG1 que se une IL-6 humana de una manera dependiente del pH acelera la eliminación de hIL-6 en comparación con hIL-6 administrada simultáneamente con CLB8-IgG1. En consecuencia, se demostró que al conferir una capacidad de unión a IL-6 humana dependiente de pH, la concentración de hIL-6 en plasma cuatro días después de la administración se puede disminuir en aproximadamente 76 veces.

Efecto de la unión a FcRn en condiciones neutras (pH 7,4)

Además de H16/L13-IgG1, H16/L13-IgG1-v2 y H16/L13-F14, que resultan de la introducción de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente en H16/L13-IgG1, se analizaron in vivo usando ratones normales. Los resultados de la prueba se compararon con los de H16/L13-IgG1. Como se muestra en la Fig. 31, la concentración de anticuerpo en plasma de H16/L13-IgG1-v2 que aumentó la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) era 2,9 veces menor que H16/L13-IgG1 al día después de la administración. Alternativamente, la concentración de anticuerpo en plasma de H16/L13-F14 que aumentó adicionalmente la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) fue 21 veces menor que H16/L13-IgG1 a las 7 horas después de la administración.

Como se muestra en la Fig. 30, se demostró que la hIL-6 administrada simultáneamente con H16/L13-IgG1-v2 o

H16/L13-F14 que tenía unión aumentada a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) se elimina marcadamente más rápido en comparación con hIL-6 administrada simultáneamente con H16/L13-IgG1. H16/L13-IgG1-v2 redujo la concentración plasmática de hIL-6 aproximadamente 10 veces en comparación con la H16/L13-IgG1 en el día 1. H16/L13-F14 redujo la concentración plasmática de hIL-6 aproximadamente 38 veces en comparación con H16/L13-IgG1 a las siete horas. En consecuencia, se reveló que la concentración plasmática de IL-6 humana se puede reducir al conferir capacidad de unión de FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4). Como se describió anteriormente, al conferir la capacidad de unión de FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4), se redujo la concentración de anticuerpo en plasma; sin embargo, se produjo un efecto de reducción de la concentración de hIL-6 en plasma, que excedió en gran medida la disminución de la concentración del anticuerpo. En forma específica, esto significa que la eliminación de IL-6 humana se puede acelerar mediante la administración el anticuerpo que se une a IL-6 humana de una manera dependiente del pH y que confiere la capacidad de unión de FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4).

Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que la concentración de antígeno en plasma no solo del receptor de IL-6 soluble humano sino también del antígeno tal como IL-6 humana también se pueden reducir significativamente mediante la administración de un anticuerpo que tiene capacidad de unión al antígeno dependiente del pH y capacidad de unión a FcRn en la condición neutra.

[Ejemplo 16] Estudio sobre la mejora del efecto de aceleración de la eliminación de la IgA humana de la proteína de fusión receptor Fc que se une a IgA humana de manera dependiente de pH

Generación de la proteína de fusión receptor Fc que se une a IgA humana de manera dependiente de pH

A0-IgG1 que comprende un dímero de A0H-IgG1 (SEC ID NO: 22) es una proteína de fusión humana de CD89-Fc. Como se describe en J. Mol. Biol. (2003) 324: 645-657, CD89 humano, también conocido como alfa receptor Fc humano I, se une a IgA humana de una manera dependiente del pH (es decir, se une fuertemente a IgA humana a pH neutro, pero se une débilmente a IgA humana a pH ácido).

Evaluación de actividad de unión dependiente de pH de la proteína de fusión de CD89-Fc a IgA humana

Las A0-IgG1 se evaluaron para determinar la actividad de unión a IgA humana (constante de disociación (KD)) a pH 6,0 y pH 7,4 usando Biacore T100 (GE Healthcare). El ensayo se llevó a cabo usando 10 mMol de ACES/150 mmol/l de NaCl que contiene tensioactivo P20 0,05% (pH 7,4 y pH 6,0) como tampón de corrida. Después de que la proteína de fusión CD89-Fc se unió a la proteína A/G recombinante (Thermo Scientific) inmovilizada sobre chips sensor usando un procedimiento de acoplamiento amino, se inyectaron concentraciones apropiadas de hIgA (IgA humana: preparada como se describe en el Ejemplo de Referencia 5) como un analito. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 ºC. Los resultados del ensayo se analizaron usando Software de Evaluación Biacore T100 (GE Healthcare) y el sensorgrama obtenido como se muestra en la Fig. 32. Está claramente demostrado que la proteína de fusión CD89-Fc tiene actividad de unión a IgA humana dependiente del pH, que se une fuertemente a IgA humana a pH neutro, pero se une débilmente a IgA humana a pH ácido.

Preparación de la proteína de fusión receptor Fc dependiente del pH que tiene actividad de unión a FcRn en condiciones neutras

Las mutaciones se introdujeron en AO-IgG1 que comprende un dímero de A0H-IgG1 (SEC ID NO: 22) para aumentar la unión a FcRn en una condición neutra (pH 7,4). En forma específica, A0-IgG1-v2 se preparó a partir de la región constante de la cadena pesada de IgG1 mediante la sustitución de Asn por Trp en la posición 426 en A0-IgG1. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 1.

A0-IgG1 que comprende un dímero de A0H-IgG1 (SEC ID NO: 22) y A0-IgG1-v2 que comprende un dímero de A0H-IgG1-v2 (SEC ID NO: 23) se expresaron y purificaron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 2.

Prueba in vivo usando ratones normales

La cinética in vivo de IgA humana (hIgA) y proteína de fusión de CD89-Fc se evaluó después de administrar hIgA sola o hIgA y proteína de fusión de CD89-Fc (A0H-IgG1 o A0H-IgG1-v2) en ratones normales (C57BL/6J ratón; Charles River, Japón). Una solución de hIgA (80 microgramos/ml) o una solución de mezcla que contiene IgA y proteína de fusión de CD89-Fc (80 microgramos/ml y 1,5 mg/ml, respectivamente, en la que la mayoría de la hIgA se unió a la proteína de fusión de CD89-Fc) se administró una vez a una dosis de 10 ml/kg en la vena caudal. La sangre se recogió a los 15 minutos, siete horas, un día, dos días, cuatro y siete días después de la administración. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15,000 rpm y 4 grados C durante 15 minutos para separar el plasma. El plasma separado se almacenó en un refrigerador a -20 grados C o menos antes del ensayo.

Medición de concentración plasmática de IgA humana por ELISA

La concentración de IgA humana en plasma de ratón se midió mediante ELISA usando hsIL-6R porque las IgA

humana recombinantes tienen región variable frente a hsIL-6R. Se dispensó anticuerpo anti- IgA humana de cabra (Bethyl Laboratories) sobre una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 grados C para preparar placas con anti-IgA humana inmovilizada. Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, o 0,00625 microgramos/ml y muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Con el fin de hacer que todas las IgA humanas en la muestra se unan a hsIL-6R, se añadieron 200 microlitros de 10 microgramos/ml de hsIL-6R a 100 microlitros de las muestras de la curva de calibración y muestras de plasma y a continuación las muestras se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se dispensaron en las placas con anti-IgA humana-inmovilizada, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió anticuerpo anti-IL-6R biotinilado (R & D) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente, y la reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato de micropocillo TMP un componente HRP (BioFX Laboratories) como sustrato. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración de hIgA en plasma después de la administración intravenosa que se mide por este procedimiento se muestra en la Fig. 33 para ratones normales.

Medición de la concentración plasmática de proteína de fusión de CD89-Fc por ELISA

La concentración de proteína de fusión de CD89-Fc en plasma de ratón se midió mediante ELISA. Se dispensó un fragmento de anticuerpo F(ab')2 anti-IgG humana (específica de cadena gamma) (Sigma) sobre una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 grados C para preparar placas con anticuerpos anti-IgG humana inmovilizados. Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 25,6, 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, y 0,4 microgramos/ml y muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Con el fin de hacer que toda la proteína de fusión de CD89-Fc en la muestra se unan a IgA humana, se añadieron 200 microlitros de 5 microgramo/ml de IgA humana a 100 microlitros de las muestras de la curva de calibración y muestras de plasma, luego las muestras se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se dispensaron en las placas con anti-IgG humana inmovilizada, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió conjugado de anti-IgG humana de cabra (específica de Fc)-fosfatasa alcalina (Sigma) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción cromogénica se llevó a cabo usando el sistema de sustratos de fosfatasa en micropocillo BluePhos (Kirkegaard & Perry Laboratories) como un sustrato y la absorbancia a 650 nm se midió en un lector de microplaca. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de concentración plasmática de proteína de fusión de CD89-Fc después de la administración intravenosa que se mide por este procedimiento se muestra en la Fig. 34 para ratones normales.

Efecto de la unión a FcRn en condiciones neutras (pH 7,4)

Además de A0-IgG1, A0-IgG1-v2 que resulta de la introducción de la sustitución de aminoácidos descrita anteriormente en A0-IgG1 se analizaron in vivo usando ratones normales. Los resultados de prueba se compararon con los de A0-IgG1. Como se muestra en la Fig. 34, la concentración plasmática de A0-IgG1-v2 que tenía unión aumentada a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) fueron 1,8 veces más bajos que A0-IgG1 dos días después de la administración.

Como se muestra en la Fig. 33, se demostró que la hIgA administrada simultáneamente con A0-IgG1-v2 que había aumentado la unión a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) se elimina marcadamente más rápido en comparación con hIgA administrada simultáneamente con A0-IgG1. A0-IgG1-v2 redujo la concentración plasmática de hIgA aproximadamente 5,7 veces en comparación con A0-IgG1 en el día dos. Como se describió anteriormente, al conferir la capacidad de unión de FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4), se redujo la concentración de anticuerpo en plasma; sin embargo, se produjo el efecto de reducción de la concentración plasmática de hIgA, que excedió en gran medida la disminución en la concentración de anticuerpo. En forma específica, esto significa que la eliminación de IgA humana se puede acelerar mediante la administración de la proteína de fusión del Fc receptor que se une a IgA humana de una manera dependiente del pH y que se confiere con la capacidad de unión de FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4).

Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que la concentración de antígeno en plasma, tal como la de la IgA humana, también se puede reducir significativamente mediante la administración de una proteína de fusión del receptor Fc que tiene tanto la capacidad de unión al antígeno dependiente del pH como la capacidad de unión a FcRn en la condición neutra. Por lo tanto, la proteína de fusión de Fc receptor también se puede manipular genéticamente para tener la capacidad de eliminar la concentración plasmática de antígeno (o ligando) del plasma.

[Ejemplo 17] Estudio sobre la mejora del efecto de aceleración de la eliminación de la plexina A1 de los anticuerpos anti-plexina A1 humana dependiente del pH (preparación de anticuerpos)

Respecto al anticuerpo de unión a la plexina humana A1 dependiente del pH

PX268-IgG1 que comprende PX268H-IgG1 (SEC ID NO: 24) y PX268L-CK (SEC ID NO: 25) es un anticuerpo anti-plexina A1 quimérico. PX141-IgG1 que comprende PX141H-IgG1 (SEC ID NO: 26) y PX141L-CK (SEC ID NO: 27) es un anticuerpo anti-plexina A1 quimérico que se une a plexina A1 humana soluble de una manera dependiente del pH (es decir, se une fuertemente a plexina A1 humana soluble a pH neutro, pero se une débilmente a plexina A1 humana soluble a pH ácido).

Evaluación de actividad de unión dependiente de pH de anticuerpo anti-plexina A1 humana para plexina A1 humana

PX268-IgG1 y PX141-IgG1 se evaluaron para determinar la actividad de unión a la plexina A1 humana (constante de disociación (KD)) a pH 6,0 y pH 7,4 con Biacore T100 (GE Healthcare). El ensayo se llevó a cabo usando 10 mMol de ACES/150 mmol/l de NaCl que contiene tensioactivo P20 0,05% (pH 7,4 y pH 6,0) como tampón de corrida. Después de que los anticuerpos se unieron a la proteína A/G recombinante (Thermo Scientific) inmovilizada sobre chips de sensor usando un procedimiento de acoplamiento amino, se inyectaron concentraciones apropiadas de hsPlexina A1 plexina A1 humana soluble: preparada como se describe en el Ejemplo de Referencia 5) como un analito. Los ensayos se realizaron a 37 °C. Los resultados del ensayo se analizaron usando el Software de Evaluación Biacore T100 (GE Healthcare) y la constante de velocidad de asociación ka (1/Ms) y la constante de velocidad de disociación k_d (1/s) Se calcularon a partir de los resultados del ensayo. A continuación, el KD (M) se calculó a partir de ka y k_d (Tabla 15). Además, se evaluó la unión dependiente del pH para calcular la relación de KD entre pH 7,4 y pH 6,0 para cada anticuerpo.

[Tabla 15]

Ligando	pH de muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD(pH6,0)/KD(pH7,4)
PX268-IgG1	pH7,4	5,2E+04	2,8E-04	5,4E-09	0,8
	pH6,0	6,3E+04	2,7E-04	4,4E-09	
PX141-IgG1	pH7,4	1,5E+05	6,4E-04	4,2E-09	14,9
	pH6,0	7,9E+04	4,9E-03	6,3E-08	

Preparación de anticuerpos anti-plexina A1 humana dependiente del pH que tienen actividad de unión a FcRn en condiciones neutras

Las mutaciones se introdujeron en PX141-IgG1 que comprende PX141H-IgG1 (SEC ID NO: 26) y PX141L-CK (SEC ID NO: 27) para aumentar la unión a FcRn en una condición neutra (pH 7,4). En forma específica, PX141H-IgG1-v2 (SEC ID NO: 28) se preparó a partir de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 mediante la sustitución de Asn por Trp en la posición 434 en la numeración EU. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 1.

PX268-IgG1 que comprende PX268H-IgG1 (SEC ID NO: 24) y PX268L-CK (SEC ID NO: 25), PX141-IgG1 que comprende PX141H-IgG1 (SEC ID NO: 26) y PX141L-CK (SEC ID NO: 27), y PX141-IgG1-v2 que comprende PX141H-IgG1-v2 (SEC ID NO: 28) y PX141L-CK (SEC ID NO: 27) se expresaron y purificaron mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica descrita en el Ejemplo de referencia 2.

Prueba in vivo usando ratones normales

La cinética in vivo de plexina A1 humana soluble (hsPlexina A1) y anticuerpo anti-plexina A1 humana se evaluó después de administrar hsPlexina A1 sola o hsPlexina A1 y anticuerpo anti-plexina A1 humana en ratones normales (C57BL/6J ratón; Charles River Japan). Una solución de hsPlexina A1 (100 microgramos/ml) o una solución de la mezcla que contiene hsPlexina A1 y anticuerpo anti-plexina A1 humana (grupo PX268-IgG1; 100 microgramos/ml de hsPlexina A1 y 1,2 mg/ml de grupo PX268-IgG1, PX141-IgG1 y PX141-IgG1-v2; 100 microgramos/ml de hsPlexina A1 y 1,0 mg/ml de PX141-IgG1 y PX141-IgG1-v2, respectivamente) se administró una vez a una dosis de 10 ml/kg en la vena caudal.

La dosis de anticuerpo se fijó de manera que más del 99,9% de plexina A1 humana soluble se unió al anticuerpo en la solución de administración. La sangre se recolectó durante 15 minutos, siete horas, un día, dos días, cuatro días,

siete días después de la administración de hsPlexina A1 y la mezcla de solución de anticuerpo anti-plexina A1 humana. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15,000 rpm y 4 grados C durante 15 minutos para separar el plasma. El plasma separado se almacenó en un refrigerador a -20 grados C o menos antes del ensayo.

Medición de concentración plasmática de PlexinaA1 humana por ELISA después de la administración de hsPlexina A1 sola

La concentración de PlexinaA1 humana en plasma de ratón se midió por ELISA utilizando anticuerpo M2 anti-FLAG biotinilado (Sigma) debido a que PlexinaA1 humana recombinante tiene la secuencia de etiqueta FLAG del extremo C terminal. El anticuerpo anti-plexina A1 humana policlonal de conejo preparado por inmunización de plexina A1 a conejo se dispensó sobre una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 grados C para preparar placas con anti-PlexinaA1 humana inmovilizada. Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 25,6, 12,8, 6,4, 3,2, 1,6 y 0,8 microgramos/ml y las muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Posteriormente, las muestras se dispensaron en las placas anti-PlexinaA1- humana inmovilizada, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente, y la reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato de micropocillo TMP un componente HRP (BioFX Laboratories) como sustrato. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración de hsPlexina A1 plasmática después de la administración intravenosa medida por este procedimiento se muestra en la Fig. 35.

Medición de concentración plasmática de PlexinaA1 humana en el gripo PX268-IgG1 por ELISA

La concentración de PlexinaA1 humana en plasma de ratón se midió por ELISA usando anticuerpo anti-FLAG M2 biotinilado (Sigma) debido a que la PlexinaA1 humana recombinante tiene la secuencia de etiqueta FLAG del extremo C terminal. El anticuerpo anti-plexina humana A1 policlonal de conejo preparado por inmunización de plexina A1 a conejo se dispensó sobre una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 grados C para preparar placas con anti-PlexinaA1 humana inmovilizada. Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 25,6, 12,8, 6,4, 3,2, 1,6 y 0,8 microgramos/ml y muestras de plasma de ratón diluidas 50 veces o más. Con el fin de que toda la PlexinaA1 humana en la muestra se unan a PX268-IgG1, se añadieron 150 microlitros de PX268-IgG1 de 40 microgramos/ml a 150 microlitros de las muestras de la curva de calibración y muestras de plasma y luego las muestras se dejaron reposar durante una noche a 37 grados C. Posteriormente, las muestras se dispensaron en las placas anti-PlexinA1 humana inmovilizada, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente (o 4 grados C). A continuación, se añadió anticuerpo anti-FLAG M2 biotinilado (Sigma) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente (o 4 grados C). Posteriormente, se añadió estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente (o 4 grados C), y la reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato de micropocillo TMP un componente HRP (BioFX Laboratories) como sustrato. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración hsPlexina A1 plasmática después de la administración intravenosa medida por este procedimiento se muestra en la Fig. 35.

Medición de concentración plasmática de PlexinaA1 humana en el grupo PX141-IgG1 y PX141-IgG1-v2 por ELISA

La concentración de PlexinaA1 humana en plasma de ratón se midió por ELISA usando anticuerpo anti-FLAG M2 biotinilado (Sigma) debido a que la PlexinaA1 humana recombinante tiene la secuencia de etiqueta FLAG del extremo C terminal. PX268-IgG1 se dispensó sobre una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 grados C para preparar placas con anti-PlexinaA1 humana inmovilizada. Se prepararon muestras de la curva de calibración que tienen concentraciones plasmáticas de 25,6, 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, y 0,8 microgramos/ml, y muestras de plasma de ratón diluidas 50 veces o más. Con el fin de que toda la PlexinaA1 humana en la muestra se unan a PX141-IgG1 o PX141-IgG1-v2, 150 microlitros de 40 microgramos/ml de PX141-IgG1 o PX141-IgG1-v2, se añadieron a 150 microlitros de las muestras de la curva de calibración y luego las muestras se dejaron reposar durante una noche a 37 grados C. Posteriormente, las muestras se dispensaron en las placas anti-PlexinA1 humana inmovilizada, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente (o 4 grados C). A continuación, se añadió anticuerpo anti-FLAG M2 biotinilado (Sigma) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente (o 4 grados C). Posteriormente, se añadió estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para reaccionar durante una hora a temperatura ambiente (o 4 grados C), y la reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato de micropocillo TMP un componente HRP (BioFX Laboratories) como sustrato. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas. La concentración en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). La concentración de hsPlexina A1 en plasma a 7 horas después de la administración intravenosa medida por este

procedimiento se muestra en la Fig. 35.

Efecto de la unión dependiente de pH a plexina A1 humana soluble

PX268-IgG1 y PX141-IgG1 que se unen a IL-6 humana de una manera dependiente del pH se analizaron in vivo, y los resultados se compararon entre ellos. Entretanto, como se muestra en la Fig. 35, se halló que hsPlexina A1 administrada simultáneamente con PX141-IgG1 que se une a plexina A1 humana soluble de una manera dependiente del pH reduce la concentración plasmática total de hsPlexina A1 en comparación con hsPlexina A1 administrada simultáneamente con PX268-IgG1.

Efecto de la unión a FcRn en condiciones neutras (pH 7,4)

Además de PX141-IgG1, PX141-IgG1-v2, que resulta de la introducción de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente en PX141-IgG1, se analizaron in vivo usando ratones normales. Los resultados de la prueba se compararon con los de PX141-IgG1.

Como se muestra en la Fig. 35, se demostró que la hsPlexina A1 administrada simultáneamente con PX141-IgG1-v2 que tenía unión aumentada a FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4) reduce la concentración plasmática total de hsPlexina A1 a un nivel no detectable (límite de detección es 0,8 microgramos/mL). En consecuencia, se reveló que la concentración de plexina A1 humana soluble se puede reducir al conferir la capacidad de unión de FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4). En forma específica, esto significa que la eliminación de plexina A1 humana soluble se puede acelerar mediante la administración del anticuerpo que se une a plexinaA1 humana de una manera dependiente del pH y que se confiere con la capacidad de unión de FcRn de ratón en una condición neutra (pH 7,4).

Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que la concentración de antígeno en plasma no solo del receptor IL-6 humano soluble sino también del antígeno tal como IL-6 humana, IgA humana y plexina A1 humana soluble también se puede reducir significativamente mediante la administración de un anticuerpo que tiene capacidad de unión al antígeno y capacidad de unión a FcRn dependiente de pH en la condición neutra.

[Ejemplo de referencia 1] Construcción de vectores de expresión para anticuerpos IgG introducidos con sustituciones de aminoácidos

Los mutantes se produjeron usando el kit de mutagénesis dirigido al sitio QuikChange (Stratagene) o el kit de clonación HD en fusión (Clontech) de acuerdo con el procedimiento descrito en las instrucciones proporcionadas y los fragmentos de plásmido resultantes se insertaron en un vector de expresión de células de mamífero para producir los vectores de expresión de cadena H y vectores de expresión de cadena L deseados. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión obtenidos se determinaron usando metodologías convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

[Ejemplo de referencia 2] Expresión y purificación del anticuerpo IgG

Los anticuerpos se expresaron mediante el procedimiento descrito a continuación. Los anticuerpos se expresaron mediante FreestyleHEK293 (Invitrogen) como se describe en el protocolo proporcionado por la fabricación o la línea celular HEK293H (Invitrogen). Se suspendió la línea celular HEK293H derivada del cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) en DMEM (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal 10% (Invitrogen). Las células se sembraron en placas a 10 ml por placa en placas para células adherentes (10 cm de diámetro; CORNING) a una densidad celular de 5 a 6 x 10^5 células/ml y se cultivaron en un incubador de CO_2 (37 ºC, CO_2 5% por un día y noche entero. A continuación, se extrajo el medio por aspiración y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). El plásmido preparado se introdujo en las células mediante el procedimiento de lipofección. Los sobrenadantes de cultivo resultantes se recogieron, se centrifugaron (aproximadamente 2000 x g, 5 min, temperatura ambiente) para eliminar las células, y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 micrones MILLEX (marca registrada) -GV (Millipore) para obtener los sobrenadantes. Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por un procedimiento conocido por los expertos en la técnica usando rProteína A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Para determinar la concentración del anticuerpo purificado, se midió la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro. Las concentraciones de anticuerpos se calcularon a partir de los valores determinados usando un coeficiente de absorbancia calculado por el procedimiento descrito en Protein Science (1995) 4: 2411-2423.

[Ejemplo de referencia 3] Preparación del receptor IL-6 humano soluble (hsIL-6R)

El receptor de IL-6 humana recombinante como antígeno se preparó como sigue. Una línea celular que expresa constitutivamente el receptor de IL-6 humana soluble (de aquí en adelante denominado como hsIL-6R) que tiene la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 357 desde el extremo N como se describe en J. Immunol. 152: 4958 - 4968 (1994) se estableció por un procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Las células se cultivaron para expresar hsIL-6R. El hsIL-6R se purificó a partir del sobrenadante del cultivo mediante dos etapas: cromatografía en columna de Sepharose 6 FF azul y cromatografía de filtración en gel. Se usó una fracción eluida como el pico principal en la etapa final como el producto de purificación final.

[Ejemplo de referencia 4] Preparación de FcRn humano

FcRn es un complejo de FcRn y beta2-microglobulina. Los cebadores de Oligo-ADN se prepararon sobre la base de la secuencia del gen FcRn humano publicado (J Exp Med. 1 de diciembre de 1994; 180 (6): 2377-81). Se preparó un fragmento de ADN que codifica el gen completo por PCR usando ADNc humano (ADNc de Placenta Marathon Ready, Clontech) como molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como molde, se amplificó por PCR un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular que contiene la región de señal (Met1 - Leu290) y se insertó en un vector de expresión de células de mamífero. Del mismo modo, se prepararon cebadores de oligo-ADN basados en la secuencia génica de beta2-microglobulina humana publicada (Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU., 99 (26): 16899-16903 (2002)). Se preparó un fragmento de ADN que codifica el gen completo mediante PCR usando ADNc humano (ADNc de Placenta Marathon Ready, Clontech) como un molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como molde, se amplificó por PCR un fragmento de ADN que codifica la proteína completa que contiene una región de señal (Met1 - Met119) y se insertó en un vector de expresión de células de mamífero.

El FcRn humano soluble se expresó mediante el siguiente procedimiento. Los plásmidos construidos para expresar FcRn humano (SEC ID NO: 30) y beta2-microglobulina (SEC ID NO: 31) se introdujeron en células de la línea celular HEK293H) derivada del cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen mediante el procedimiento de lipofección utilizando PEI Polyscience). Se recogió el sobrenadante de cultivo resultante y se purificó FcRn usando IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences), seguido de purificación adicional usando HiTrap Q HP (GE Healthcare) (J Immunol., 1 de noviembre de 2002; 169 (9): 5171-80).

[Ejemplo de referencia 5] Preparación de IgA humana (hIgA)

hIgA que comprende H (WT)-IgA1 (SEC ID NO: 29) y L (WT) (SEC ID NO: 5) se expresó y purificó mediante el procedimiento conocido por los expertos en la técnica usando rProteína L-agarosa (ACTIgen) seguido por cromatografía por filtración en gel.

[Ejemplo de referencia 6] Preparación de plexina A1 humana soluble (hsPlexina A1)

Se preparó la plexina humana soluble A1 recombinante como un antígeno (de aquí en adelante hsPlexina A1) como sigue. HsPlexina A1 se construyó por referencia a la secuencia de referencia de NCBI (NP_115618). Especialmente, hsPlexina A1 estaba compuesto de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 27 - 1243 de la etiqueta FLAG de referencia NCBI mencionada anteriormente (DYKDDDDK) se conectó a su extremo terminal C. HsPlexina A1 se expresó transitoriamente usando FreeStyle293 (Invitrogen) y se purificó a partir del sobrenadante del cultivo mediante dos etapas: cromatografía en columna anti-FLAG y cromatografía de filtración en gel. Se usó una fracción eluida como el pico principal en la etapa final como el producto de purificación final.

Listado de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Moléculas de unión a antígeno que promueven la eliminación del antígeno

<130> C1-A1004Y1P

<150> JP 2010-079667
<151> 2010-03-30

<150> JP 2010-250830
<151> 2010-11-09

<160> 31

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 1

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
```

```
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 2

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

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

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

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 3
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 3

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
```

```
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Trp Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435                 440                 445
```

<210> 4
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
            20                  25                  30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
```

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 6
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
            20                  25                  30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
```

```
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 7

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

```
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
            20                  25                  30

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 8
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 8

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

```
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
            20                  25                  30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
```

```
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 9
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
            20                  25                  30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
```

```
Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
```

```
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 10
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 10

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
            20                  25                  30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
```

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Phe Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
```

```
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Tyr His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 11
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 11

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Pro
```

<210> 12
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 12

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Pro
```

<210> 13
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 13

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 14
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 14

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
```

```
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Pro
```

<210> 15

<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
            20                  25                  30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
```

```
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
            260                 265                 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        355                 360                 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    370                 375                 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                405                 410                 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
            420                 425                 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440
```

<210> 16
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 16

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
```

```
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 17
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 17

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
            20                  25                  30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
                85                  90                  95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
    130                 135                 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145                 150                 155                 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
            180                 185                 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
        195                 200                 205

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 18
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 18

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
```

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 19
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 19

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
            20                  25                  30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
                85                  90                  95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
    130                 135                 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145                 150                 155                 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
            180                 185                 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
        195                 200                 205

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 20
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 20

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
```

```
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 21
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 21

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
            20                  25                  30
```

```
Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Trp Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
```

```
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 22
<211> 436
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 22

```
Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro
1               5                   10                  15

Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg
            20                  25                  30

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg
        35                  40                  45

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe
    50                  55                  60
```

```
Val Ile Asp His Met Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu
                85                  90                  95

Val Val Thr Gly Leu Tyr Gly Lys Pro Phe Leu Ser Ala Asp Arg Gly
            100                 105                 110

Leu Val Leu Met Pro Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala
        115                 120                 125

His Ile Pro Phe Asp Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly
145                 150                 155                 160

Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr
                165                 170                 175

Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu
            180                 185                 190

Val Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
    210                 215                 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                 230                 235                 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
                245                 250                 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
            260                 265                 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
        275                 280                 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
    290                 295                 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305                 310                 315                 320
```

```
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
                325                 330                 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
            340                 345                 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
        355                 360                 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
    370                 375                 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385                 390                 395                 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
                405                 410                 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
            420                 425                 430

Leu Ser Leu Ser
        435
```

<210> 23
<211> 436
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 23

```
Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro
1               5                   10                  15

Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg
            20                  25                  30

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg
        35                  40                  45

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe
    50                  55                  60

Val Ile Asp His Met Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu
                85                  90                  95
```

```
Val Val Thr Gly Leu Tyr Gly Lys Pro Phe Leu Ser Ala Asp Arg Gly
            100                 105                 110

Leu Val Leu Met Pro Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala
        115                 120                 125

His Ile Pro Phe Asp Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly
145                 150                 155                 160

Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr
                165                 170                 175

Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu
            180                 185                 190

Val Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
    210                 215                 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                 230                 235                 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
                245                 250                 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
            260                 265                 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
        275                 280                 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
    290                 295                 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305                 310                 315                 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
                325                 330                 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
            340                 345                 350
```

```
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
        355                 360                 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
    370                 375                 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385                 390                 395                 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
                405                 410                 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser
            420                 425                 430

Leu Ser Leu Ser
        435
```

<210> 24
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 24

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

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

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

Ala Cys Ile Tyr Ile Gly Ser Asp Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
    50                  55                  60

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

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

Arg Trp Asp Asn Ser Gly Arg Ala Leu Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125
```

```
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    370                 375                 380
```

```
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                405                 410                 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            420                 425                 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 25
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 25

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

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

His Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
    50                  55                  60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Asn Tyr Asp Cys Gly
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Cys His Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 26
<211> 454
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 26

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

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

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

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser
    50                  55                  60

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

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
                85                  90                  95

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
```

```
145                 150                 155                 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
        355                 360                 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 27
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 27

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

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Pro Asn Ile Tyr Asn Asn
            20                  25                  30

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

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

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Ser Tyr Asp
                85                  90                  95

Asn Asp Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 28
<211> 454
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 28

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

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

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

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser
    50                  55                  60

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

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
                85                  90                  95

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160
```

```
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
        355                 360                 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

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

            420                 425                 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 29

<211> 472
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 29

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
            20                  25                  30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala
    130                 135                 140

Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp
145                 150                 155                 160

Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln
                165                 170                 175
```

```
Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro
            180                 185                 190

Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His
        195                 200                 205

Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser
    210                 215                 220

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
225                 230                 235                 240

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
            260                 265                 270

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
        275                 280                 285

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
    290                 295                 300

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
305                 310                 315                 320

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
                325                 330                 335

Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
    370                 375                 380

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385                 390                 395                 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
                405                 410                 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
            420                 425                 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
        435                 440                 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met
    450                 455                 460

Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
465                 470
```

<210> 30

<211> 365
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

```
Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
1               5                   10                  15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
            20                  25                  30

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

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
    50                  55                  60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
65                  70                  75                  80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
                85                  90                  95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
            100                 105                 110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
        115                 120                 125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
    130                 135                 140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
145                 150                 155                 160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
                165                 170                 175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
            180                 185                 190
```

```
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
        195                 200                 205

Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
    210                 215                 220

Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
225                 230                 235                 240

Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
                245                 250                 255

Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
            260                 265                 270

Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
        275                 280                 285

Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
    290                 295                 300

Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
305                 310                 315                 320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
                325                 330                 335

Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
            340                 345                 350

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
        355                 360                 365
```

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

```
Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1               5                   10                  15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
            20                  25                  30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
        35                  40                  45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
```

```
    50                  55                  60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65                  70                  75                  80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
                85                  90                  95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
            100                 105                 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
        115
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de unión a FcRn humano, que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5 y a pH 7,0 y una actividad de unión al antígeno a pH 5,5 menor que a pH 7,0, donde la actividad de unión a FcRn humano a pH 7,0 y a 25 °C es mayor que KD 3,2 μM, donde el dominio de unión a FcRn humano es un dominio Fc resultante de la sustitución de al menos un aminoácido en el dominio Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana por un aminoácido diferente.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la razón de actividades de unión al antígeno a pH 5,5 y a pH 7,0 es al menos 2 en el valor de KD (a pH 5,5)/KD (a pH 7,0).

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que comprende una mutación de aminoácido del dominio de unión al antígeno, que comprende una sustitución de al menos un aminoácido del dominio de unión al antígeno por histidina o la inserción de al menos una histidina.

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el dominio de unión al antígeno se obtiene a partir de la biblioteca de dominiod de unión al antígeno.

5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el dominio de unión a FcRn humano es un dominio de unión a FcRn humano que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los de posiciones 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, y 436 (numeración EU) en el dominio Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana por un aminoácido diferente.

6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un dominio de unión a FcRn humano que comprende sustitución de aminoácido en el dominio Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, que comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada de:

una sustitución de aminoácido de Gly por Met en la posición 237;

una sustitución de aminoácido de Pro por Ala en la posición 238;

una sustitución de aminoácido de Ser por Lys en la posición 239;

una sustitución de aminoácido de Lys por Ile en la posición 248;

una sustitución de aminoácido de Thr por Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 250;

una sustitución de aminoácido de Met por Phe, Trp, o Tyr en la posición 252;

una sustitución de aminoácido de Ser por Thr en la posición 254;

una sustitución de aminoácido de Arg por Glu en la posición 255;

una sustitución de aminoácido de Thr por Asp, Glu, o Gln en la posición 256;

una sustitución de aminoácido de Pro por Ala, Gly, He, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, o Val en la posición 257;

una sustitución de aminoácido de Glu por His en la posición 258;

una sustitución de aminoácido de Asp por Ala en la posición 265;

una sustitución de aminoácido de Asp por Phe en la posición 270;

una sustitución de aminoácido de Asn por de Ala, o Glu en la posición 286;

una sustitución de aminoácido de Thr por His en la posición 289;

una sustitución de aminoácido de Asn por Ala en la posición 297;

una sustitución de aminoácido de Ser por Gly en la posición 298;

una sustitución de aminoácido de Val por Ala en la posición 303;

una sustitución de aminoácido de Val por Ala en la posición 305;

una sustitución de aminoácido de Thr por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, o Tyr en la posición 307;

una sustitución de aminoácido de Val por Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, o Thr en la posición 308;

una sustitución de aminoácido de Leu o Val por Ala, Asp, Glu, Pro, o Arg en la posición 309;

una sustitución de aminoácido de Gln por Ala, His, o He en la posición 311;

una sustitución de aminoácido de Asp por Ala, o His en la posición 312;

una sustitución de aminoácido de Leu por Lys o Arg en la posición 314;

una sustitución de aminoácido de Asn por Ala o His en la posición 315;

una sustitución de aminoácido de Lys por Ala en la posición 317;

una sustitución de aminoácido de Asn por Gly en la posición 325;

una sustitución de aminoácido de Ile por Val en la posición 332;

una sustitución de aminoácido de Lys por Leu en la posición 334;

una sustitución de aminoácido de Lys por His en la posición 360;

una sustitución de aminoácido de Asp por Ala en la posición 376;

una sustitución de aminoácido de Glu por Ala en la posición 380;

una sustitución de aminoácido de Glu por Ala en la posición 382;

una sustitución de aminoácido de Asn o Ser por Ala en la posición 384;

una sustitución de aminoácido de Gly por Asp o His en la posición 385;

una sustitución de aminoácido de Gln por Pro en la posición 386;

una sustitución de aminoácido de Pro por Glu en la posición 387;

una sustitución de aminoácido de Asn por Ala o Ser en la posición 389;

una sustitución de aminoácido de Ser por Ala en la posición 424;

una sustitución de aminoácido de Met por Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, o Tyr en la posición 428;

una sustitución de aminoácido de His por Lys en la posición 433;

una sustitución de aminoácido de Asn por Ala, Phe, His, Ser, Trp, o Tyr en la posición 434;

y una sustitución de aminoácido de Tyr por His o Phe en la posición 436 en la numeración EU.

7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, cuyo dominio de unión a FcRn humano comprende al menos un aminoácido seleccionado de:

Met en la posición de aminoácido 237;

Ala en la posición de aminoácido 238;

Lys en la posición de aminoácido 239;

Ile en la posición de aminoácido 248;

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

Phe, Trp, o Tyr como un aminoácido en la posición 252;

Thr en la posición de aminoácido 254;

Glu en la posición de aminoácido 255;

Asp, Glu, o Gln en la posición de aminoácido 256;

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

His en la posición de aminoácido 258;

Ala en la posición de aminoácido 265;

Phe en la posición de aminoácido 270;

Ala o Glu en la posición de aminoácido 286;

His en la posición de aminoácido 289;

Ala en la posición de aminoácido 297;

Gly en la posición de aminoácido 298;

Ala en la posición de aminoácido 303;

Ala en la posición de aminoácido 305;

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

Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gin, o Thr en la posición de aminoácido 308;

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

Ala, His, o Ile en la posición de aminoácido 311;

Ala o His en la posición de aminoácido 312;

Lys o Arg en la posición de aminoácido 314;

Ala o His en la posición de aminoácido 315;

Ala en la posición de aminoácido 317;

Gly en la posición de aminoácido 325;

Val en la posición de aminoácido 332;

Leu en la posición de aminoácido 334;

His en la posición de aminoácido 360;

Ala en la posición de aminoácido 376;

Ala en la posición de aminoácido 380;

Ala en la posición de aminoácido 382;

Ala en la posición de aminoácido 384;

Asp o His en la posición de aminoácido 385;

Pro en la posición de aminoácido 386;

Glu en la posición de aminoácido 387;

Ala o Ser en la posición de aminoácido 389;

Ala en la posición de aminoácido 424;

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

Lys en la posición de aminoácido 433;

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

His o Phe como un aminoácido en la posición 436 (numeración EU) en el dominio Fc de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene una actividad antagonista.

9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se une a un antígeno de membrana o antígeno soluble.

10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte a pH 7,0 que antes de la alteración de al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano del anticuerpo que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5;

(b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo y seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno más fuerte a pH 7,0 que a pH 5,5;

(c) obtener un gen que codifica un anticuerpo en el que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) y (b) están ligados; y

(d) producir un anticuerpo que usa el gen preparado en (c).

13. Un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte a pH 7,0 que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano del anticuerpo que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5;

(b) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno más fuerte a pH 7,0 que a pH 5,5;

(c) obtener un gen que codifica un anticuerpo en que un dominio de unión a FcRn humano y un dominio de unión al antígeno preparado en (a) y (b) se ligan; y

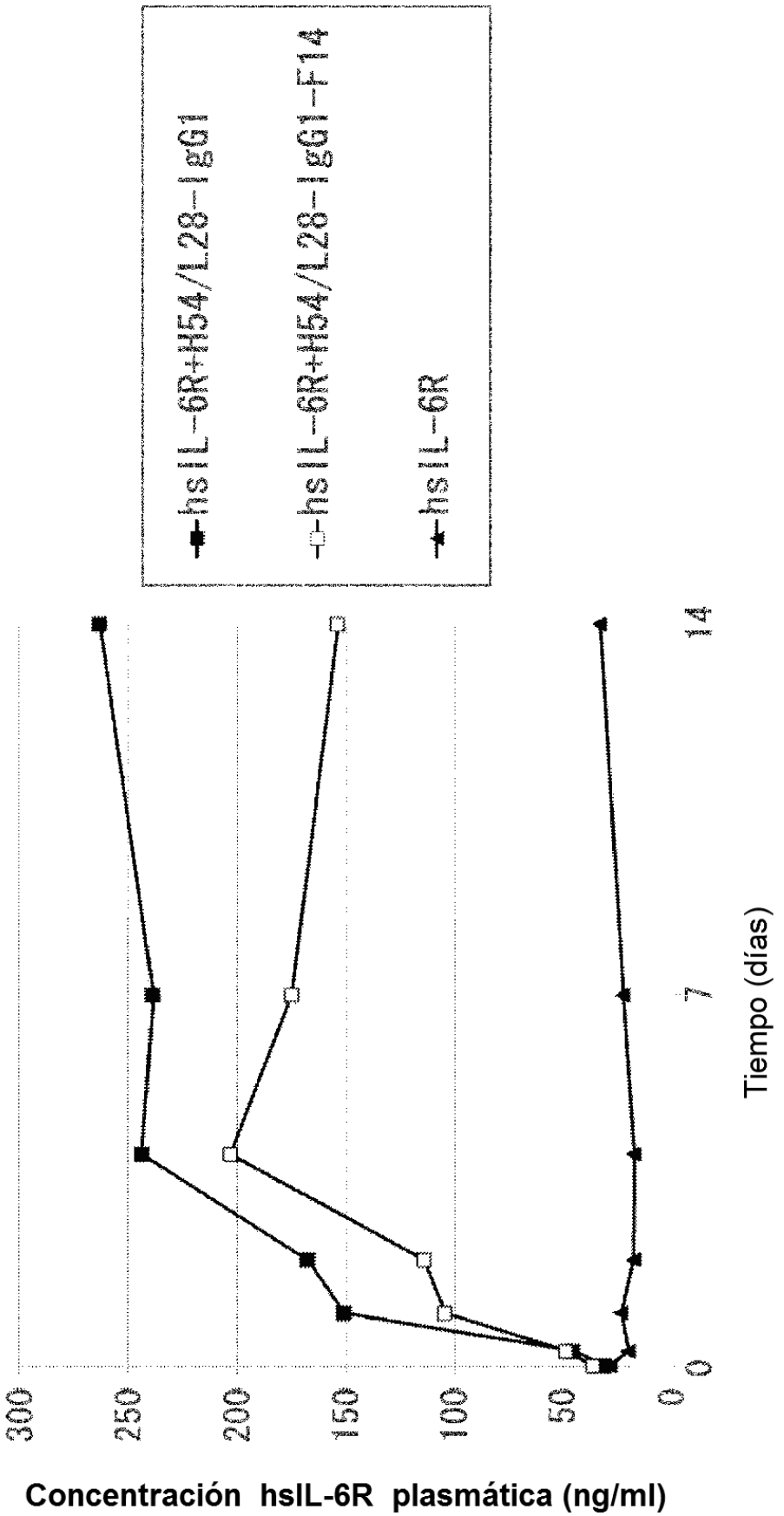
(d) producir un anticuerpo usando el gen preparado en (c).

14. Un procedimiento para la detección de un anticuerpo, que comprende las etapas de:

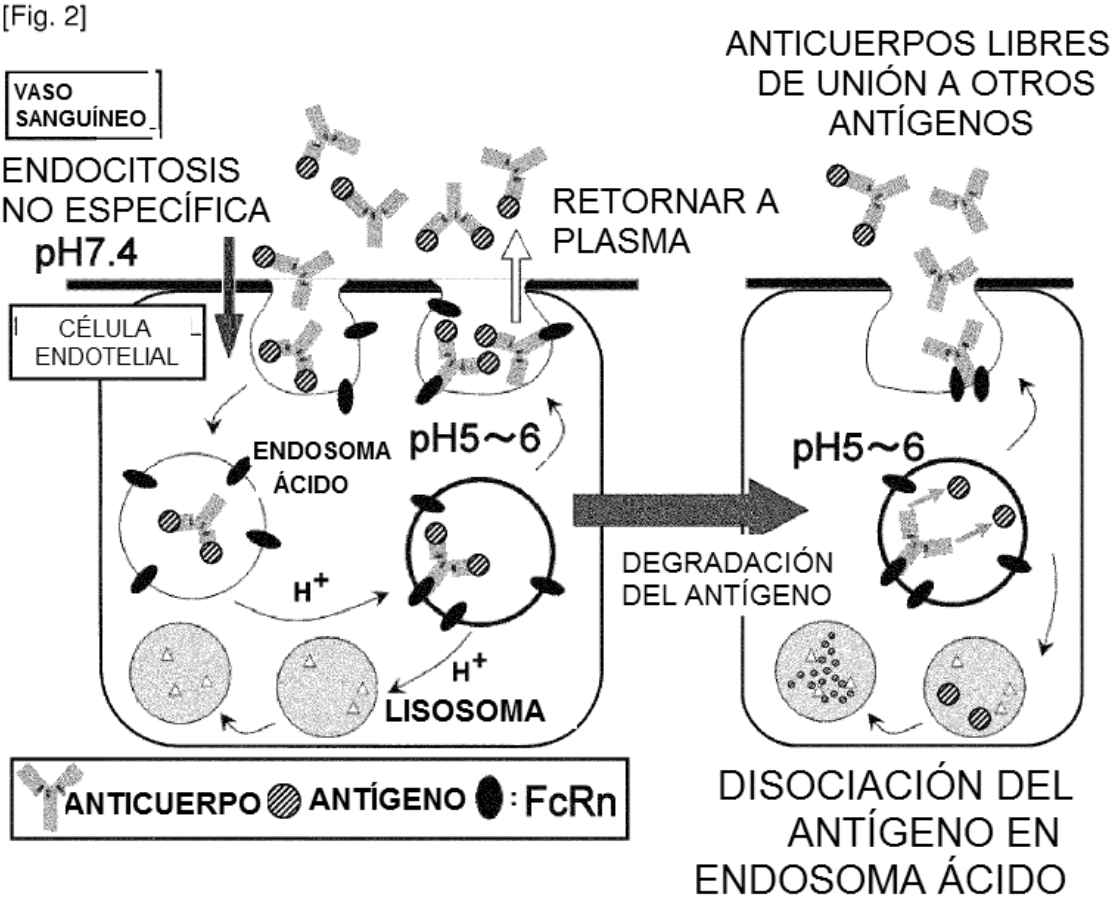
(a) seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión a FcRn humano más fuerte a pH 7,0 que antes de la alteración del al menos un aminoácido en el dominio de unión a FcRn humano del anticuerpo que tiene una actividad de unión a FcRn humano a pH 5,5; y

(b) alterar al menos un aminoácido en el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo y seleccionar un anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno más fuerte a pH 7,0 que a pH 5,5.

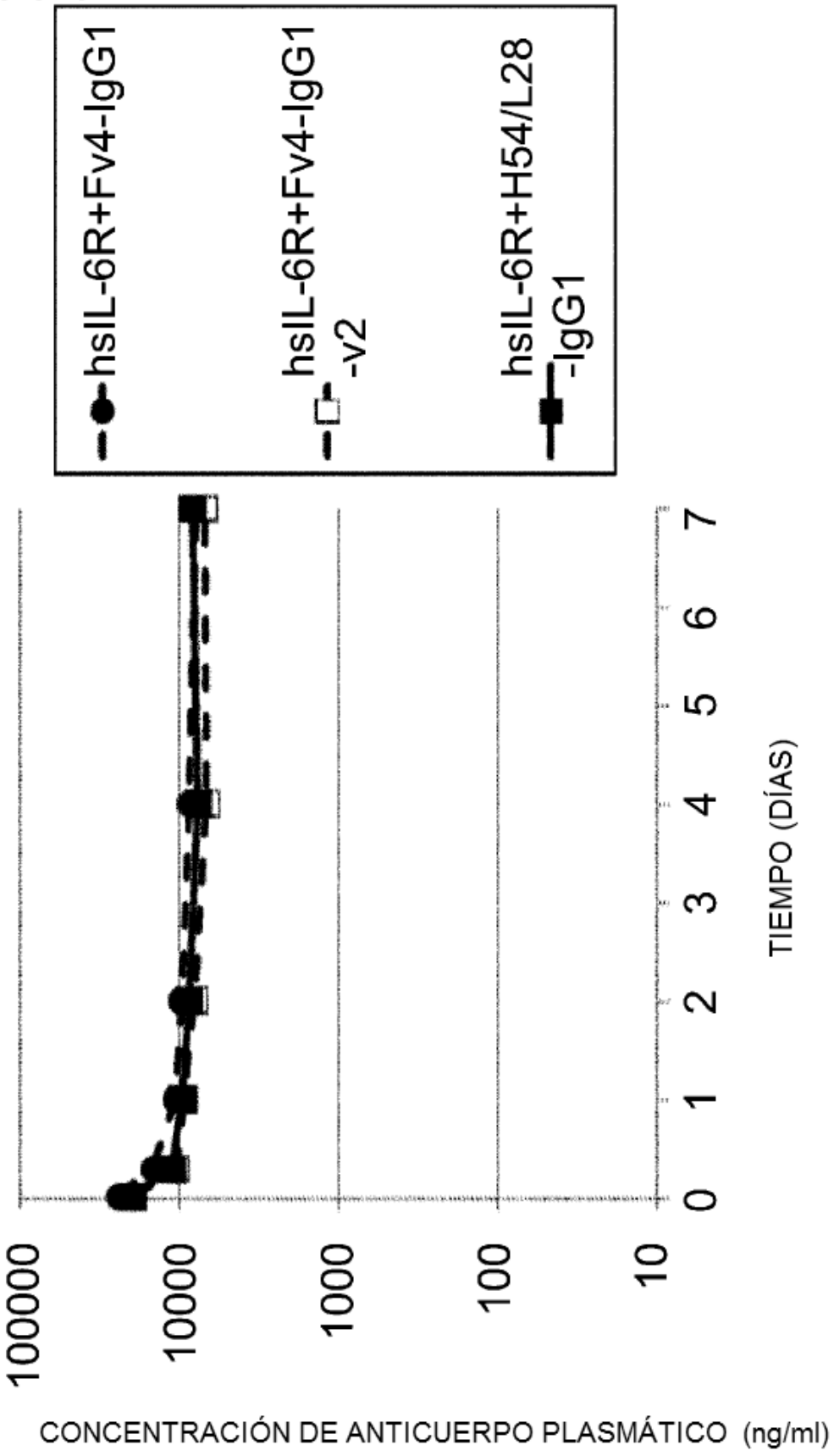
[Fig. 1]


hsIL-6R+H54/L28-IgG1
hsIL-6R+H54/L28-IgG1-F14
hsIL-6R
300
250
200
150
100
50
0
0
7
14
Tiempo (días)
Concentración hsIL-6R plasmática (ng/ml)

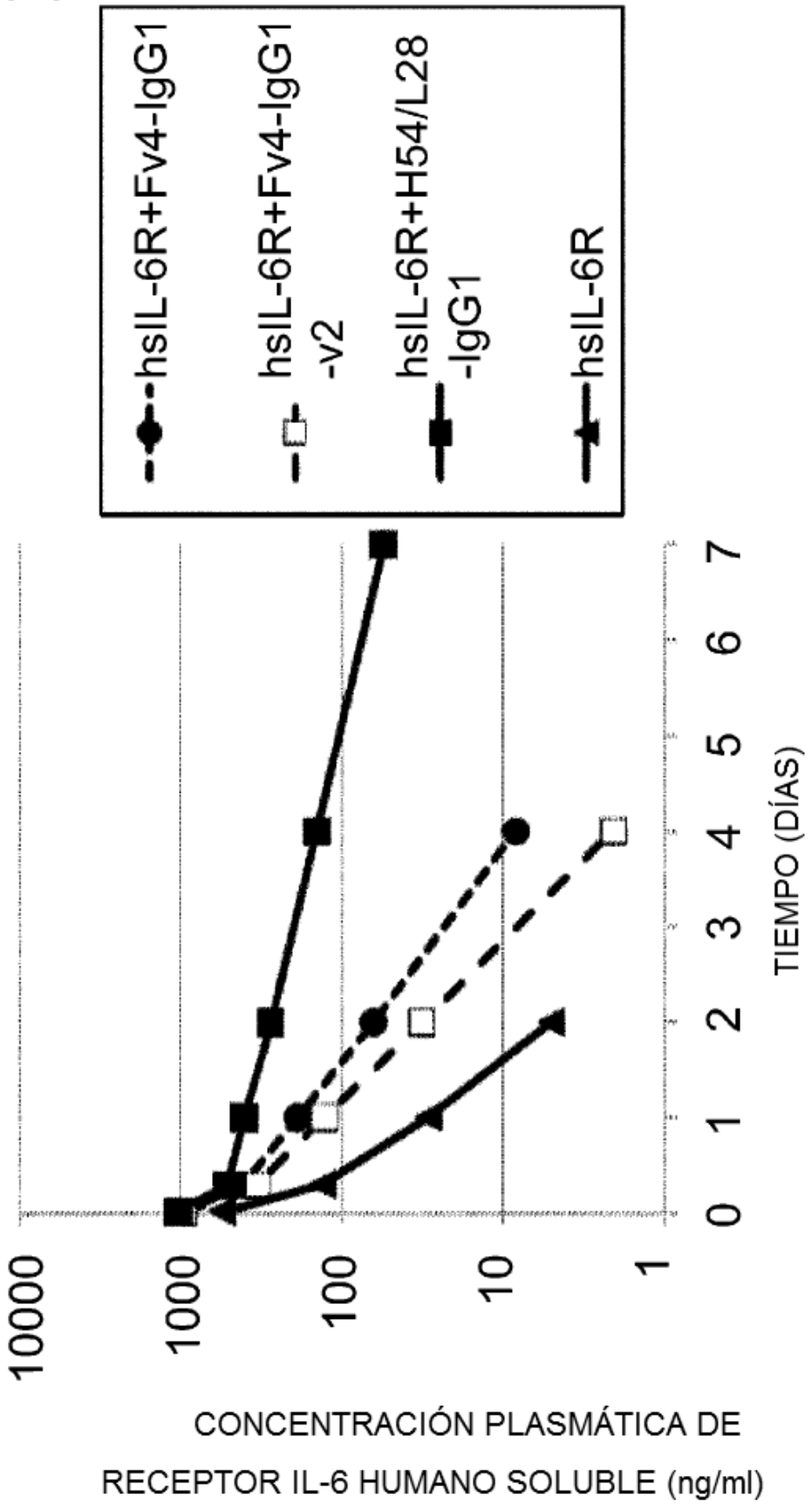
[Fig. 2]


VASO SANGUÍNEO
ENDOCITOSIS NO ESPECÍFICA
pH7.4
CÉLULA ENDOTELIAL
RETORNAR A PLASMA
ANTICUERPOS LIBRES DE UNIÓN A OTROS ANTÍGENOS
ENDOSOMA ÁCIDO
pH5~6
H+
H+
LISOSOMA
DEGRADACIÓN DEL ANTÍGENO
pH5~6
ANTICUERPO
ANTÍGENO
FcRn
DISOCIACIÓN DEL ANTÍGENO EN ENDOSOMA ÁCIDO

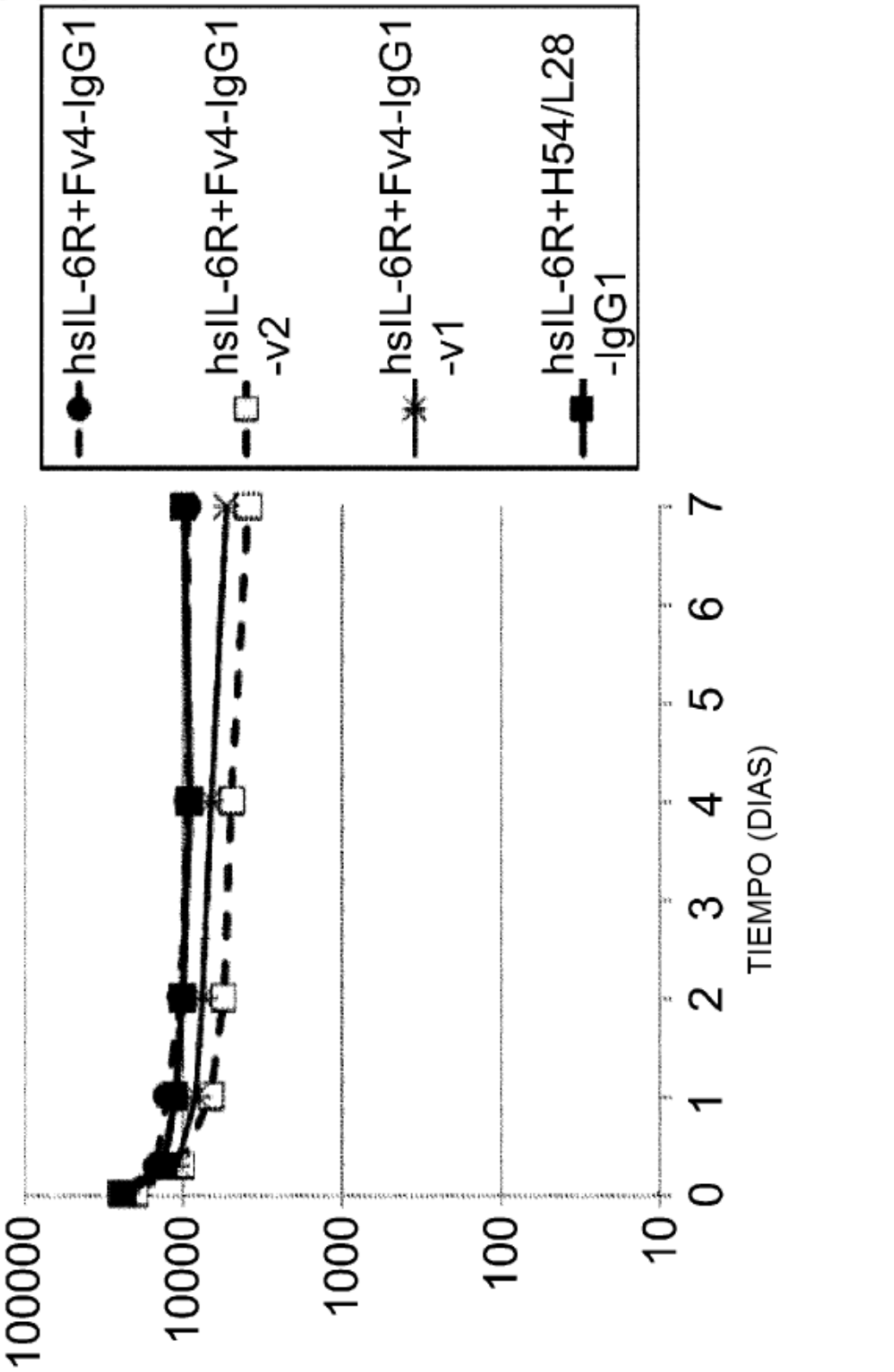
[Fig. 3]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
100000
10000
1000
100
10
0
1
2
3
4
5
6
7
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO PLASMÁTICO (ng/ml)

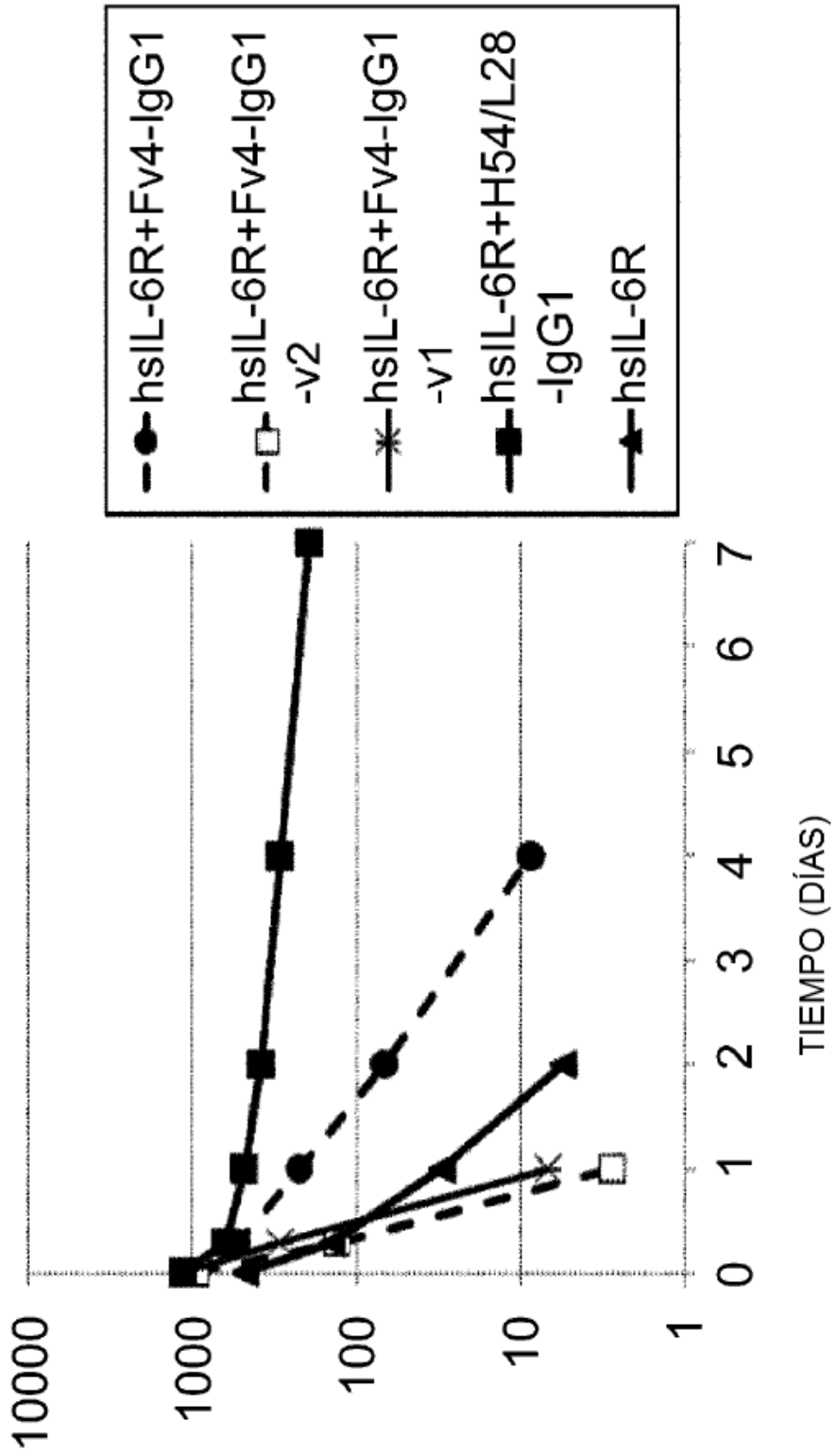
[Fig. 4]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0 1 2 3 4 5 6 7
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RECEPTOR IL-6 HUMANO SOLUBLE (ng/ml)

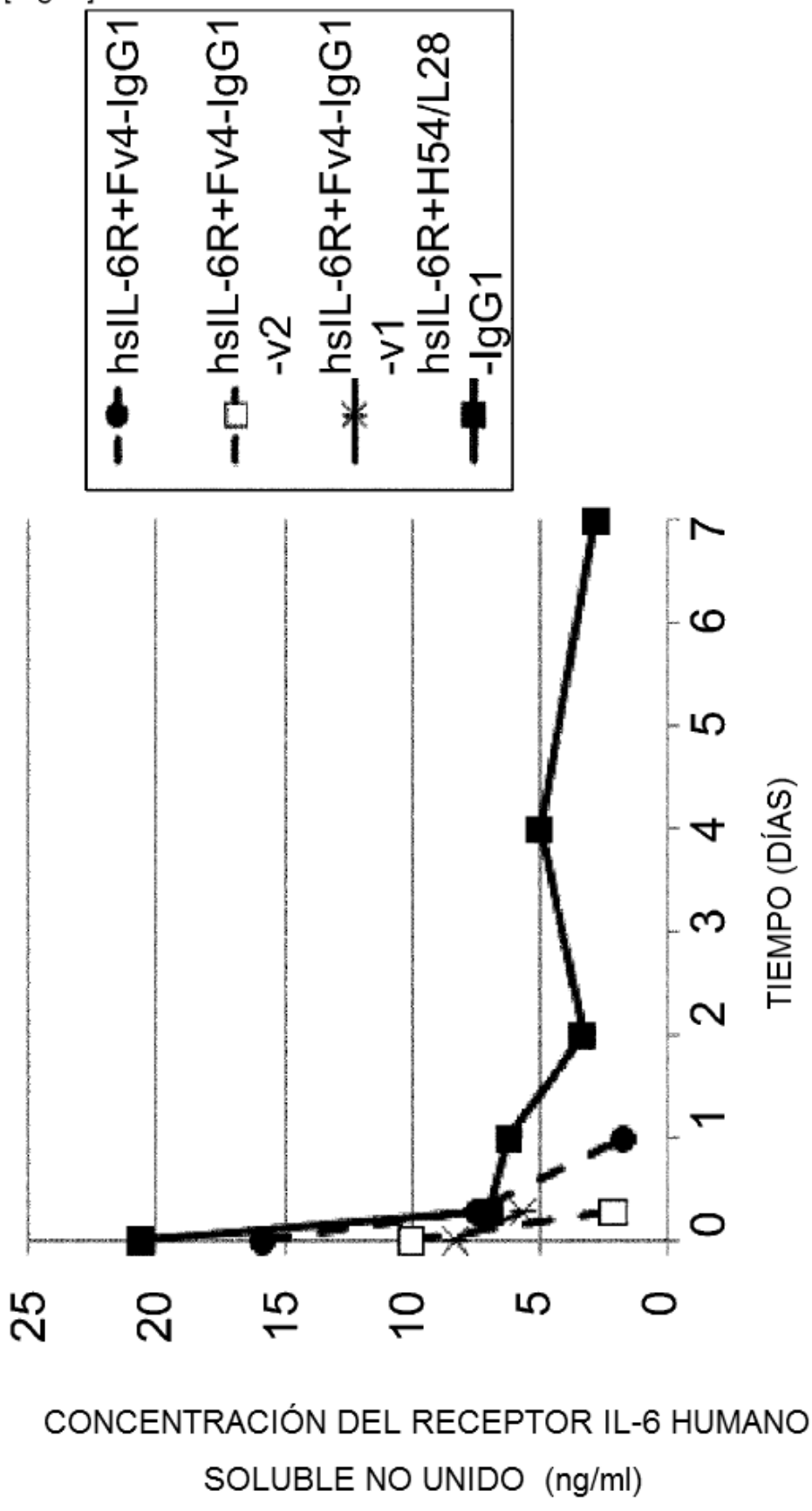
[Fig. 5]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v1
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
100000
10000
1000
100
10
0
1
2
3
4
5
6
7
TIEMPO (DIAS)
CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO EN PLASMA (ng/ml)

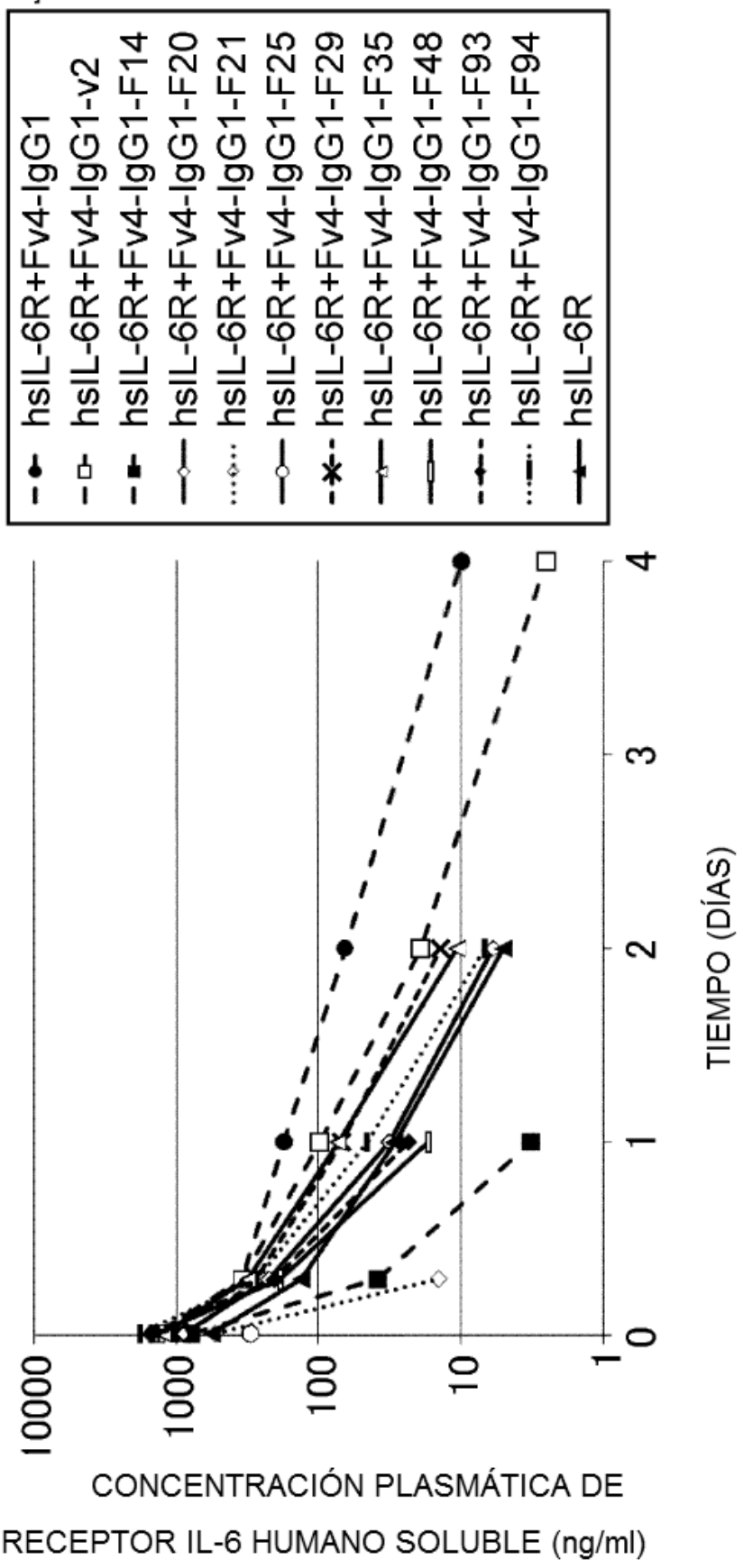
[Fig. 6]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v1
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RECEPTOR IL-6 HUMANO SOLUBLE (ng/ml)

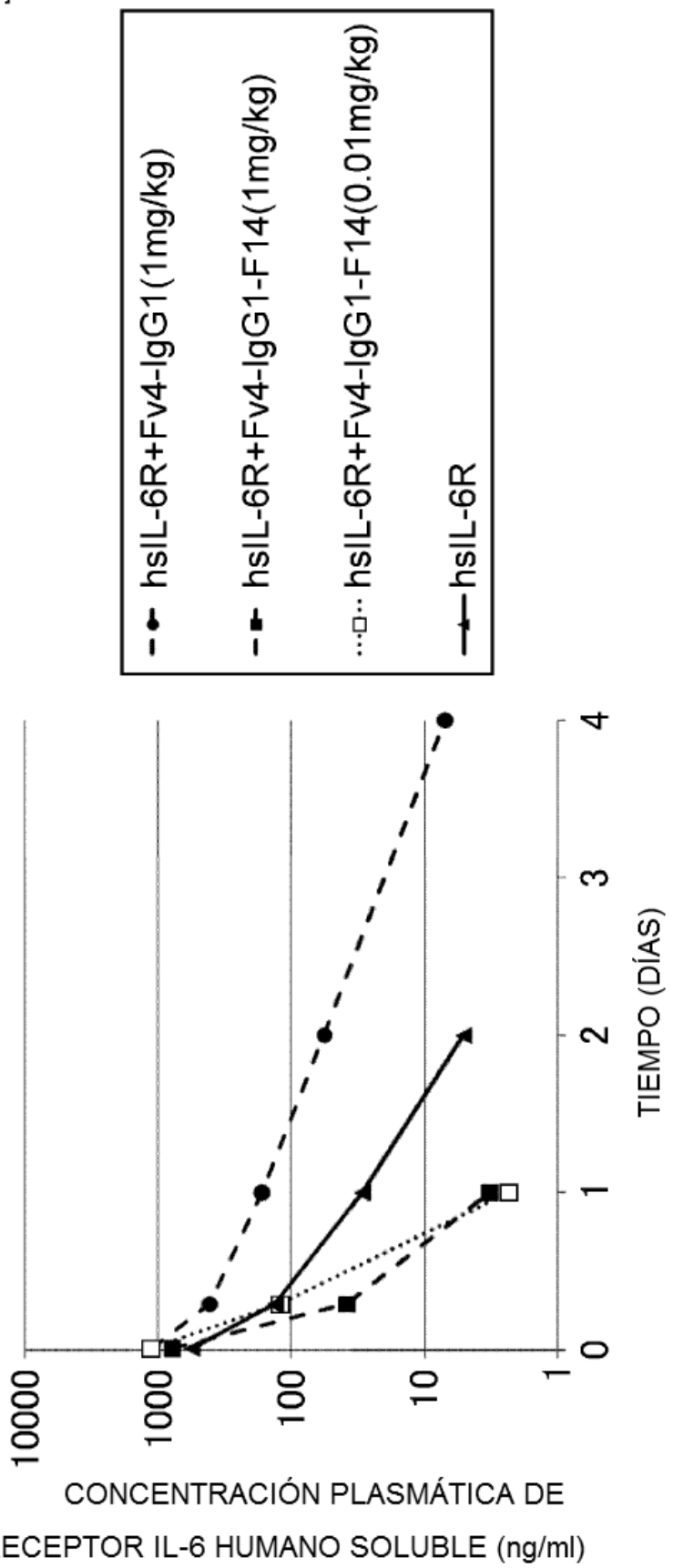
[Fig. 7]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v1
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN DEL RECEPTOR IL-6 HUMANO SOLUBLE NO UNIDO (ng/ml)

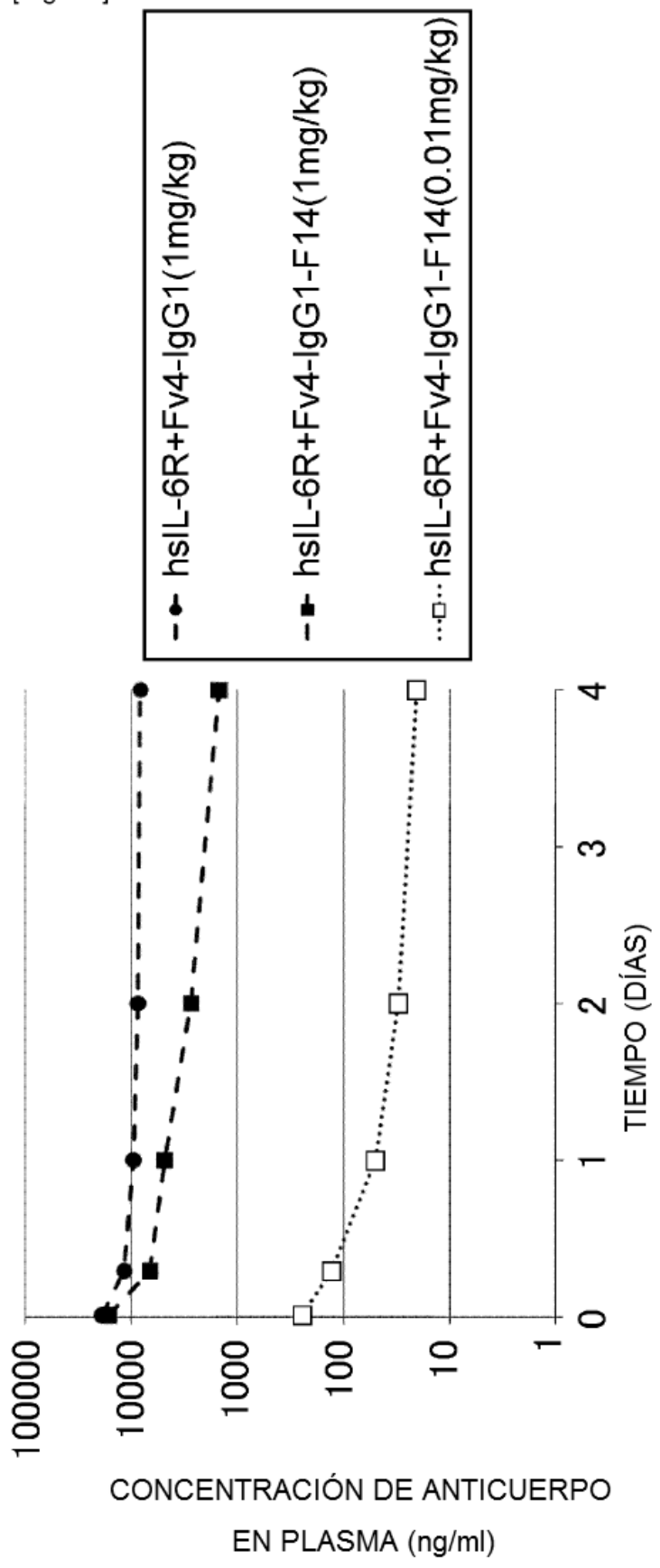
[Fig. 8]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F20
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F21
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F25
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F29
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F35
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F93
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F94
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE
RECEPTOR IL-6 HUMANO SOLUBLE (ng/ml)

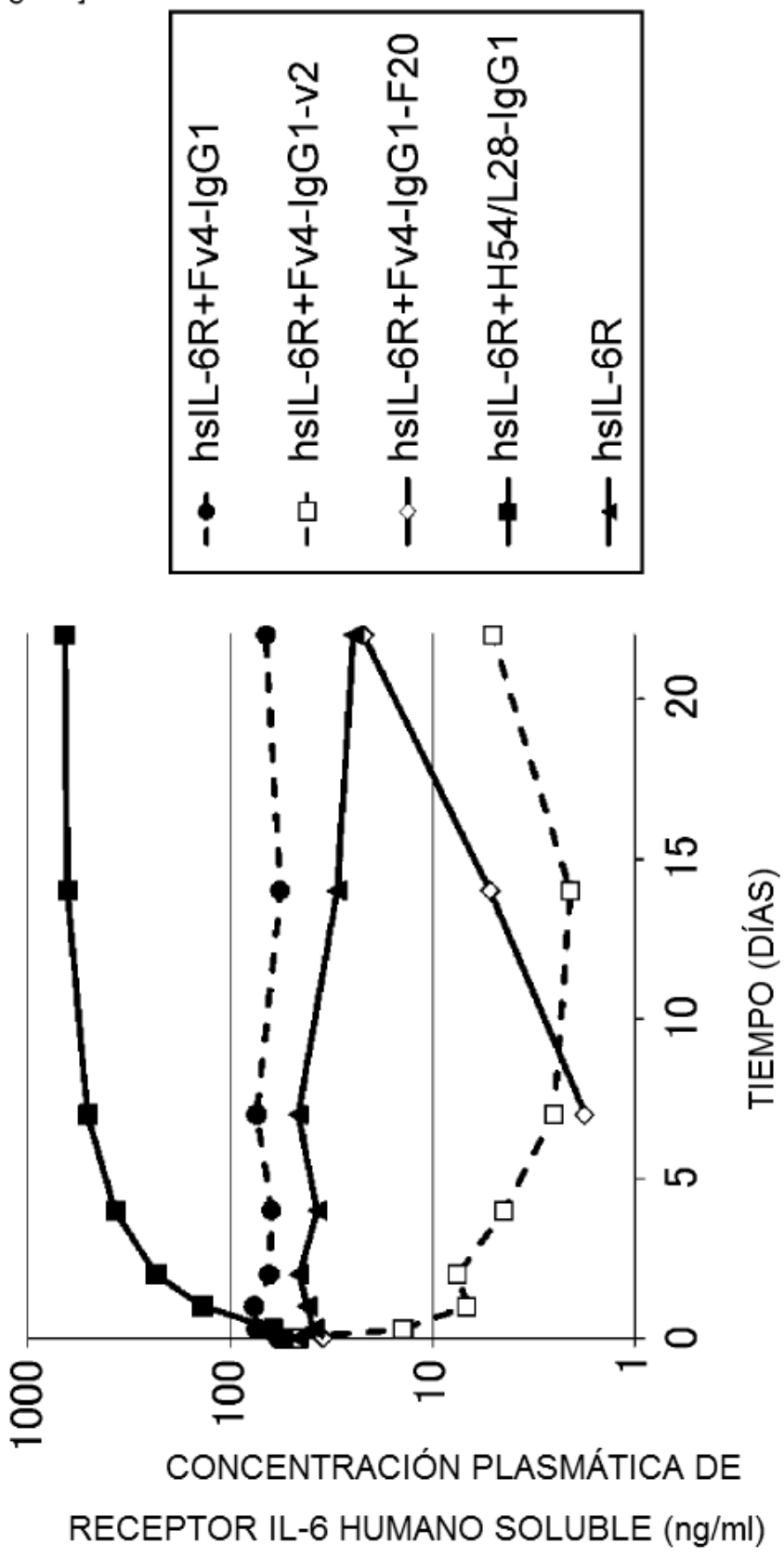
[Fig. 9]


hsIL-6R+Fv4-IgG1(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(0.01mg/kg)
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE
RECEPTOR IL-6 HUMANO SOLUBLE (ng/ml)

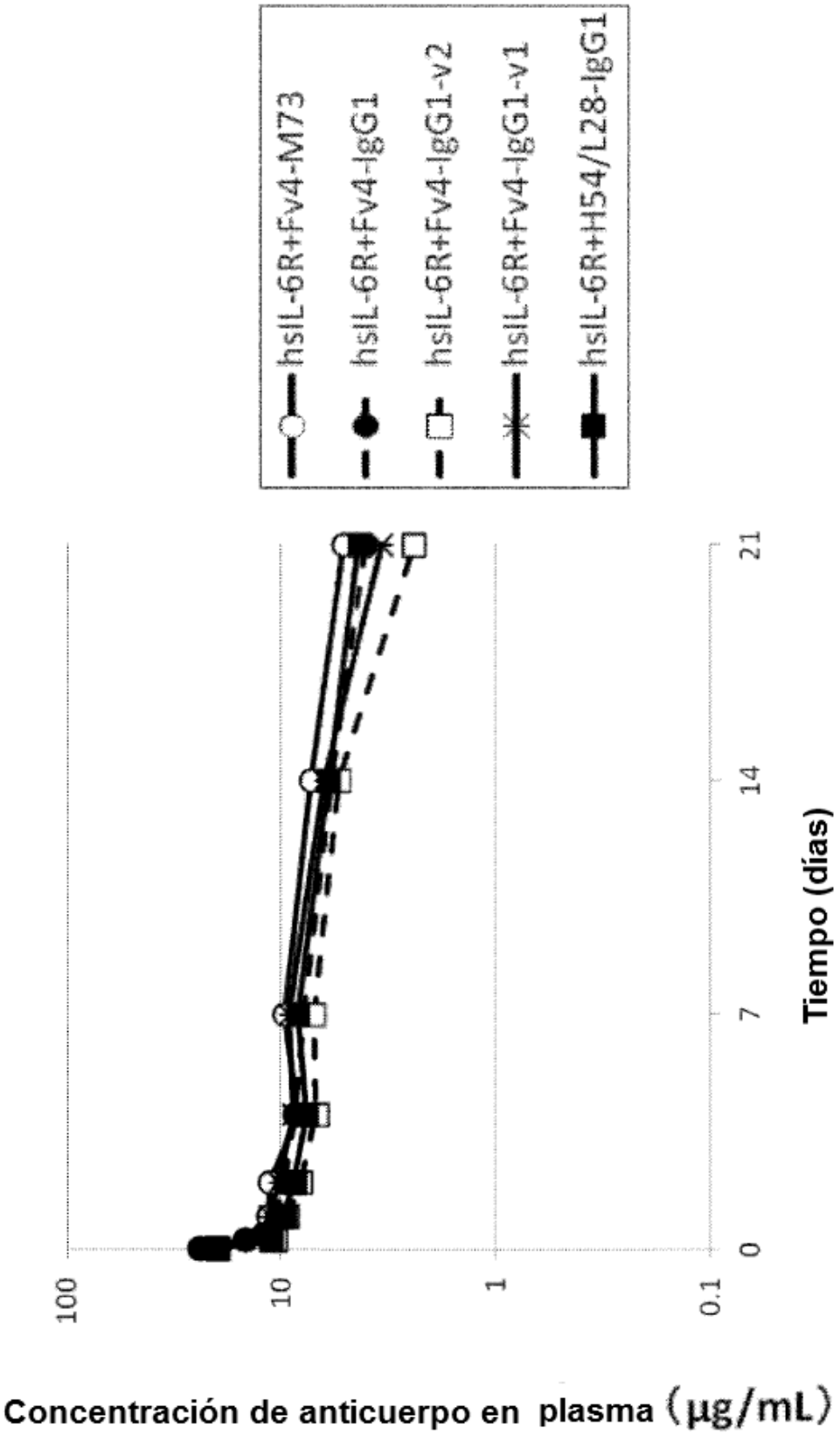
[Fig. 10]


hsIL-6R+Fv4-IgG1(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(0.01mg/kg)
100000
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO
EN PLASMA (ng/ml)

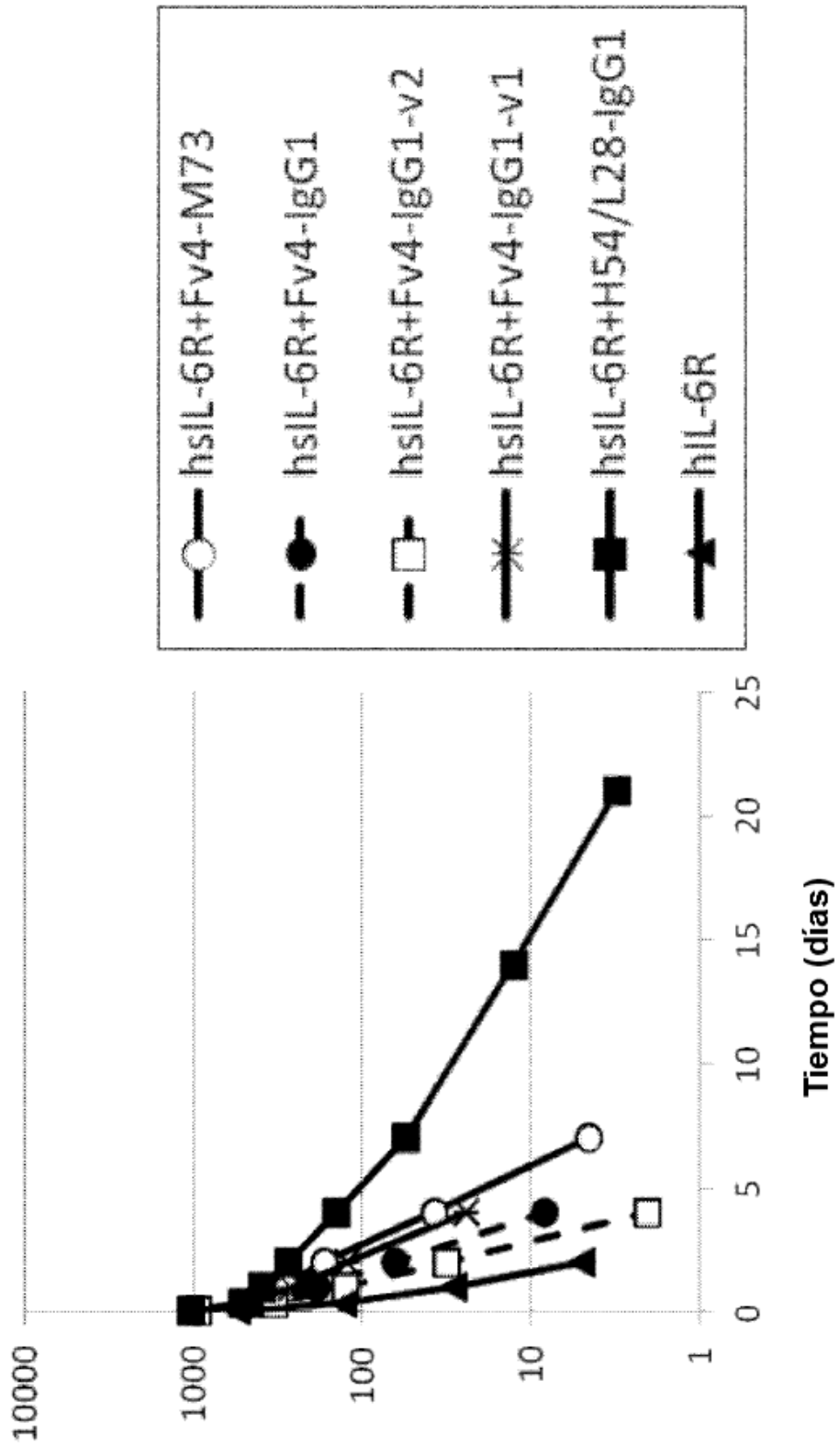
[Fig. 11]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F20
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
hsIL-6R
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
TIEMPO (DÍAS)
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE
RECEPTOR IL-6 HUMANO SOLUBLE (ng/ml)

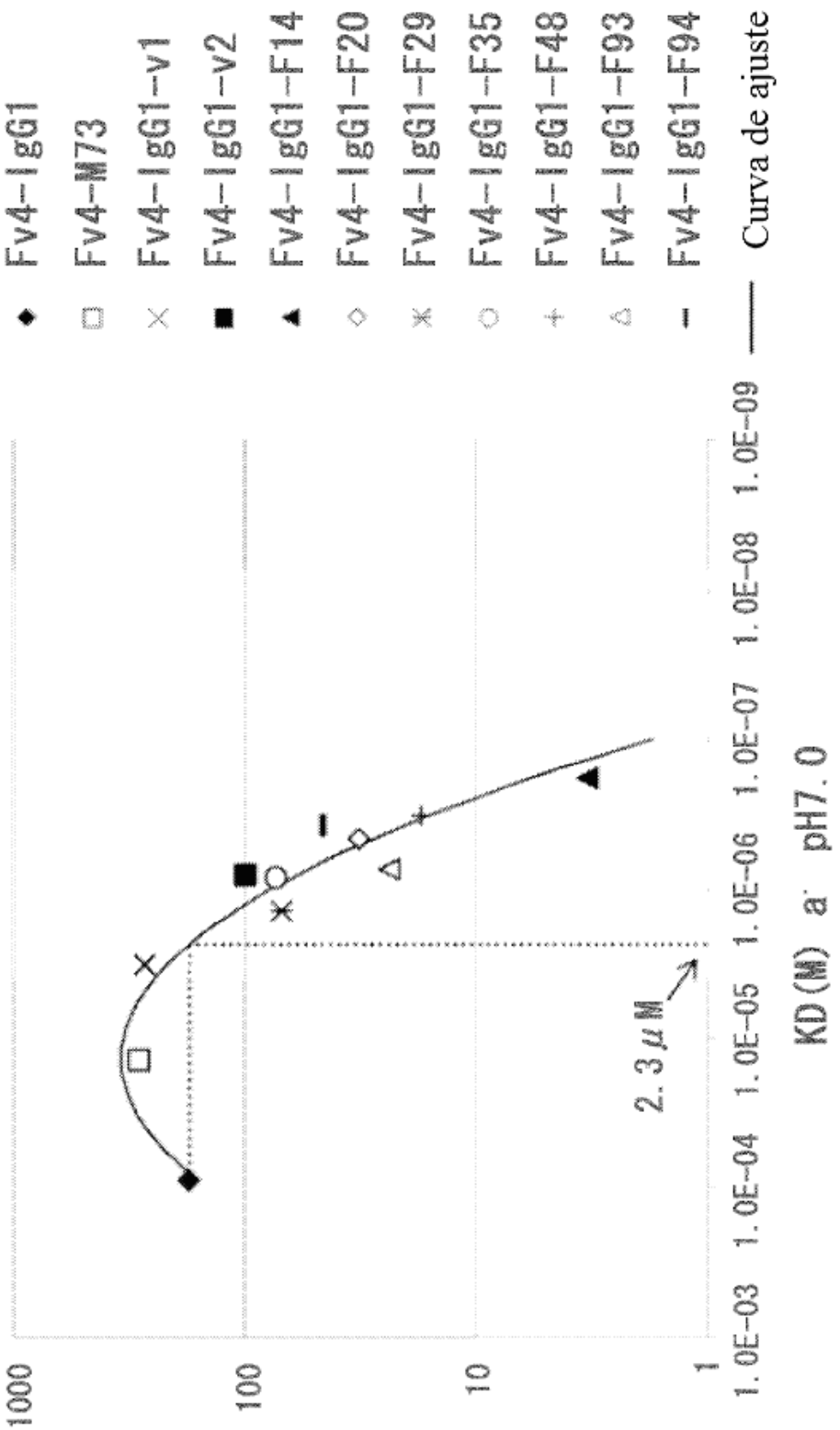
[Fig. 12]


hsIL-6R+Fv4-M73
hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v1
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
100
10
1
0.1
0
7
14
21
Tiempo (días)
Concentración de anticuerpo en plasma (µg/mL)

[Fig. 13]

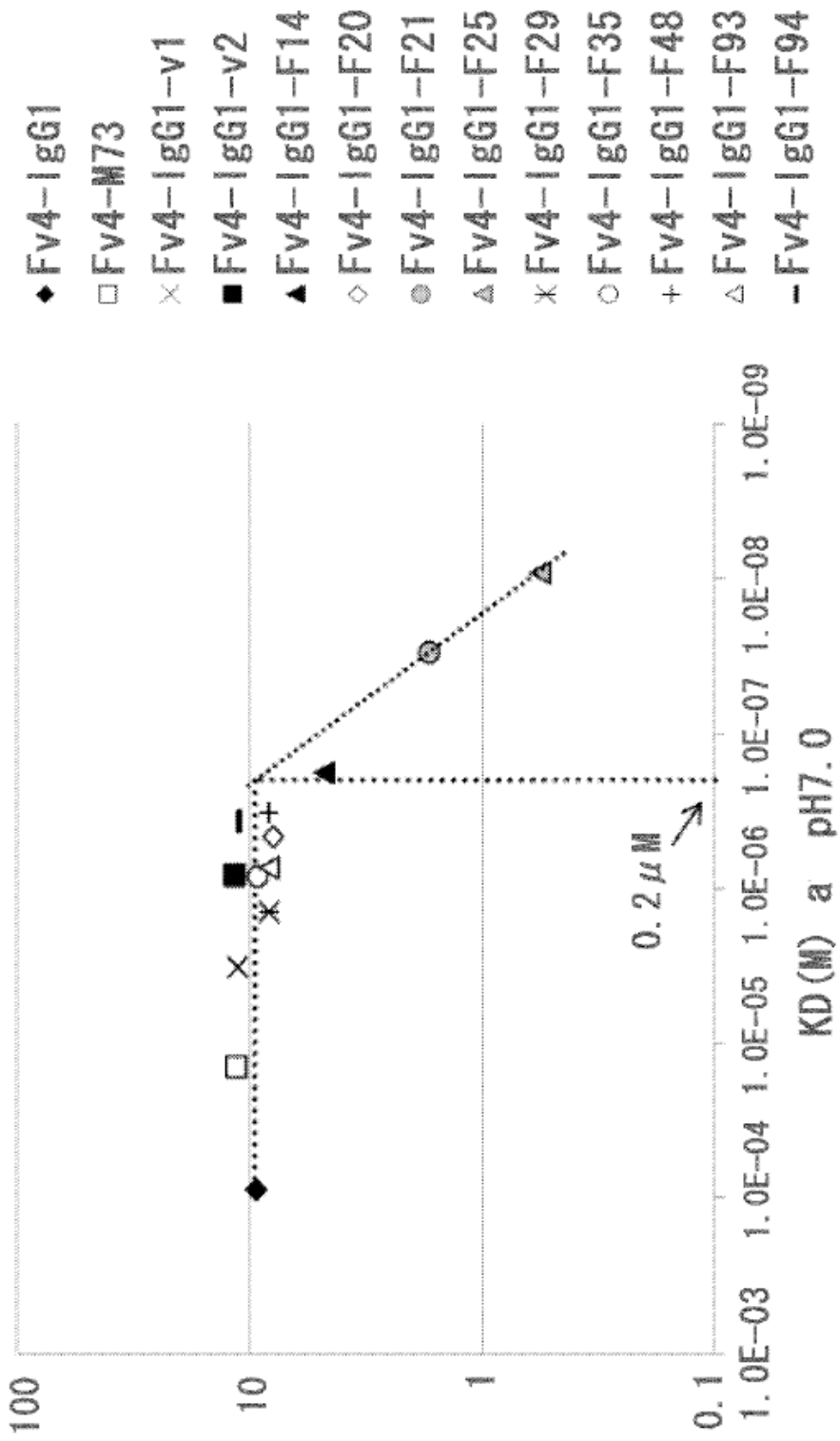

hsIL-6R+Fv4-M73
hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v1
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
hIL-6R
10000
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
Tiempo (días)
Concentración de hsIL-6R en plasma
(ng/mL)

[Fig. 14]



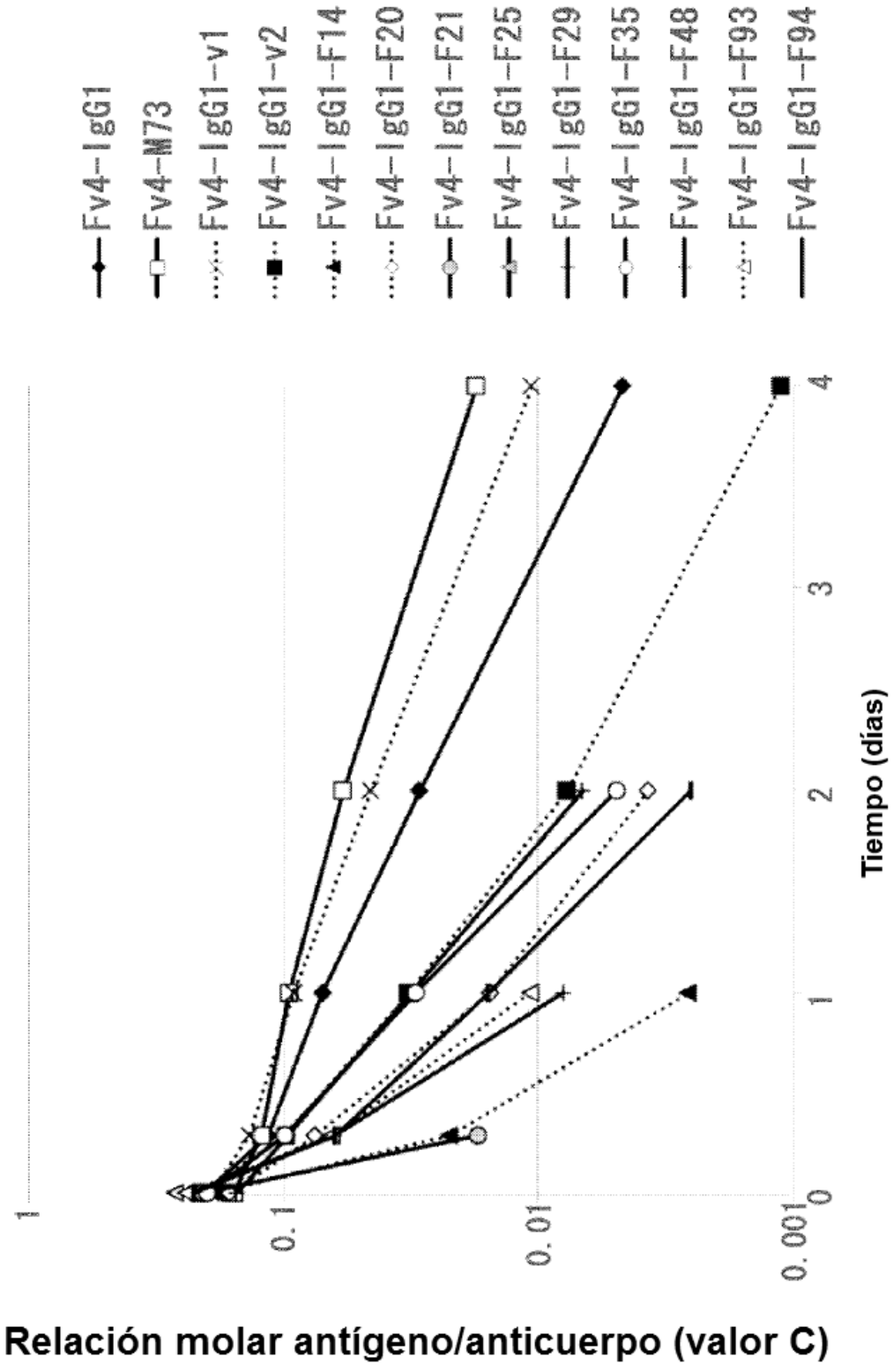
Concentración de hsIL-6R en plasma después de 1 día de administración (ng/ml)

[Fig. 15]

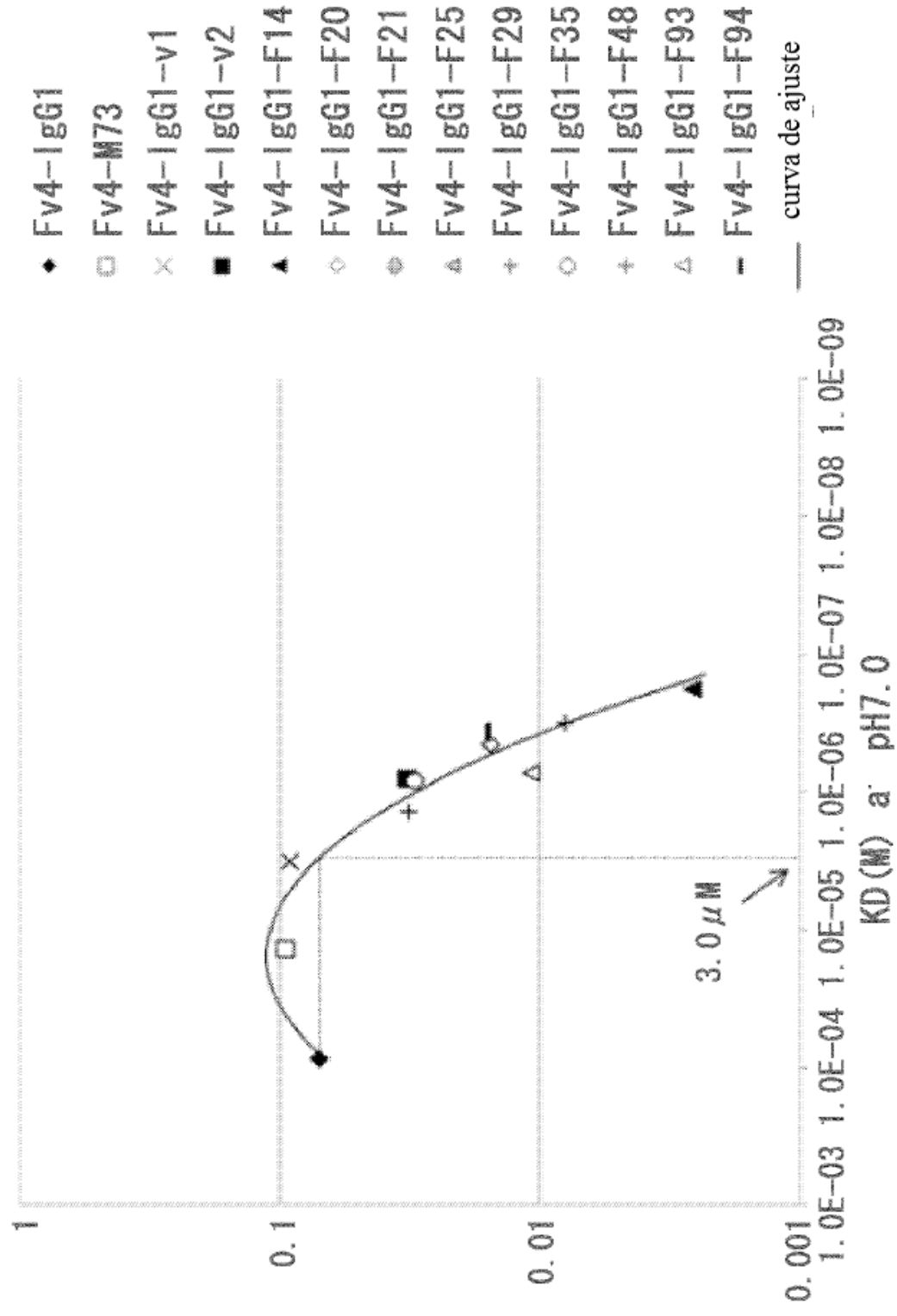


Concentración plasmática de anticuerpo después de 1 día de administración (μg/mL)

[Fig. 16]

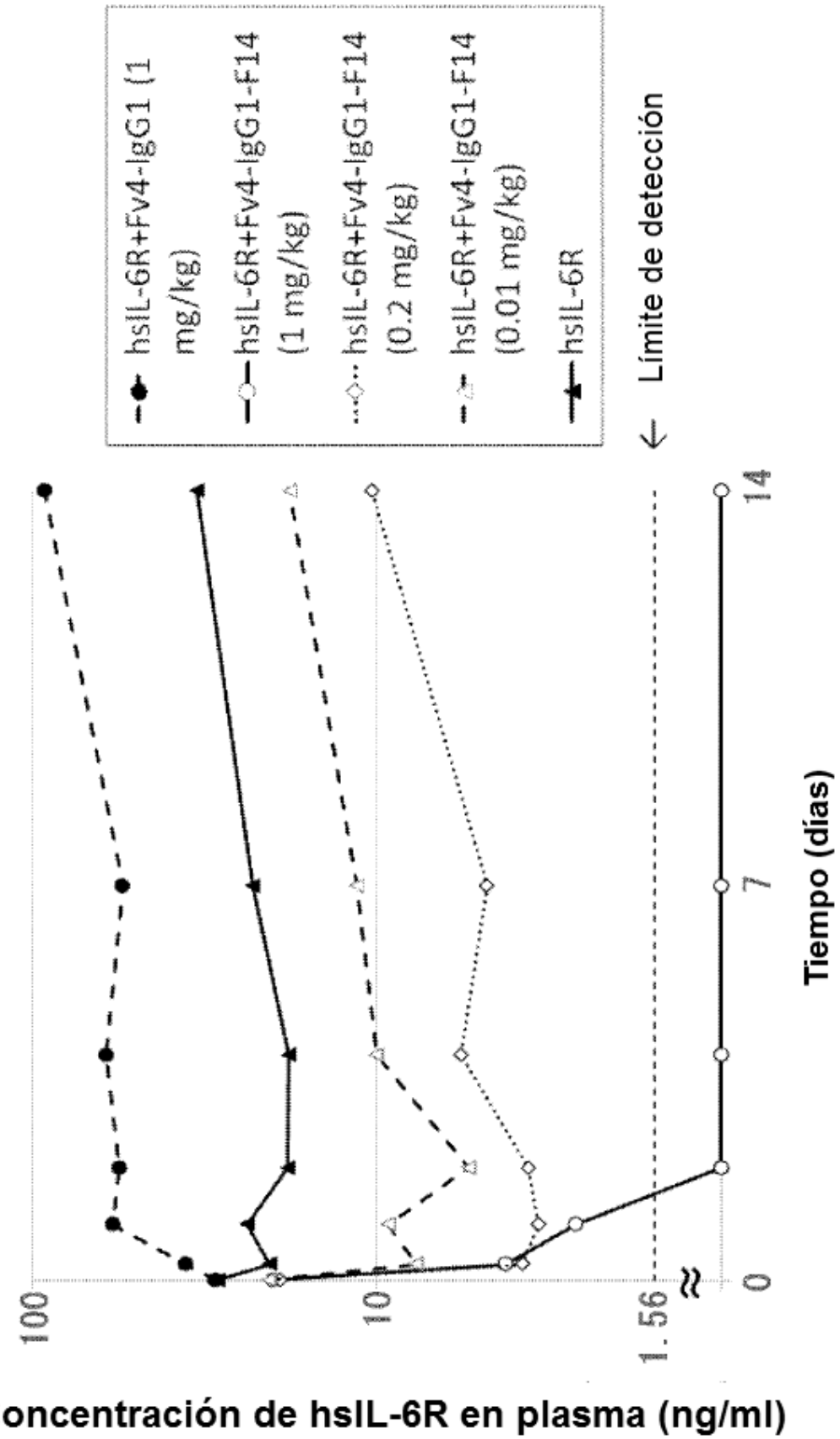

Fv4-IgG1
Fv4-M73
Fv4-IgG1-v1
Fv4-IgG1-v2
Fv4-IgG1-F14
Fv4-IgG1-F20
Fv4-IgG1-F21
Fv4-IgG1-F25
Fv4-IgG1-F29
Fv4-IgG1-F35
Fv4-IgG1-F48
Fv4-IgG1-F93
Fv4-IgG1-F94
1
0.1
0.01
0.001
0
1
2
3
4
Tiempo (días)
Relación molar antígeno/anticuerpo (valor C)

[Fig. 17]

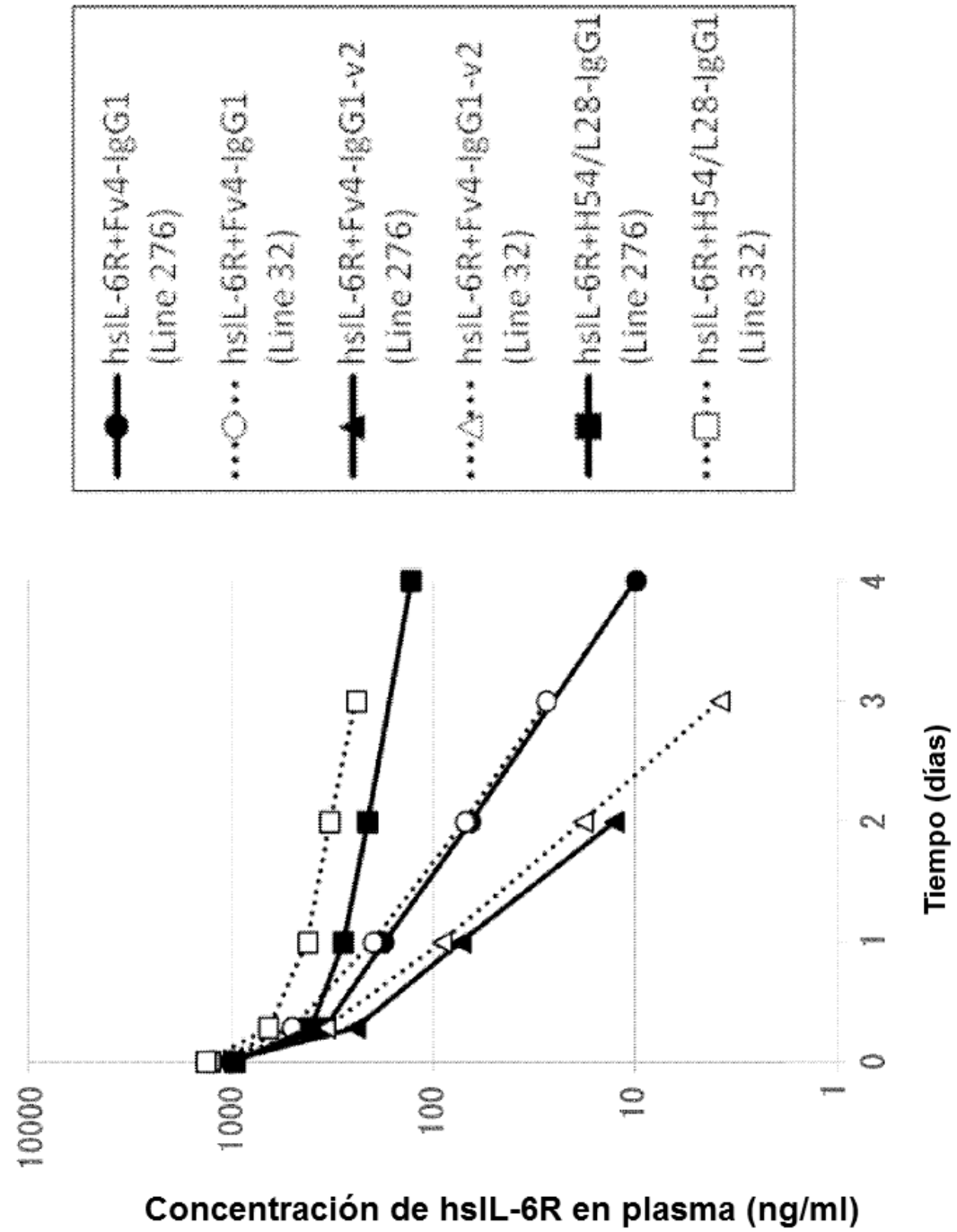


Relación molar antígeno/anticuerpo (valor C)

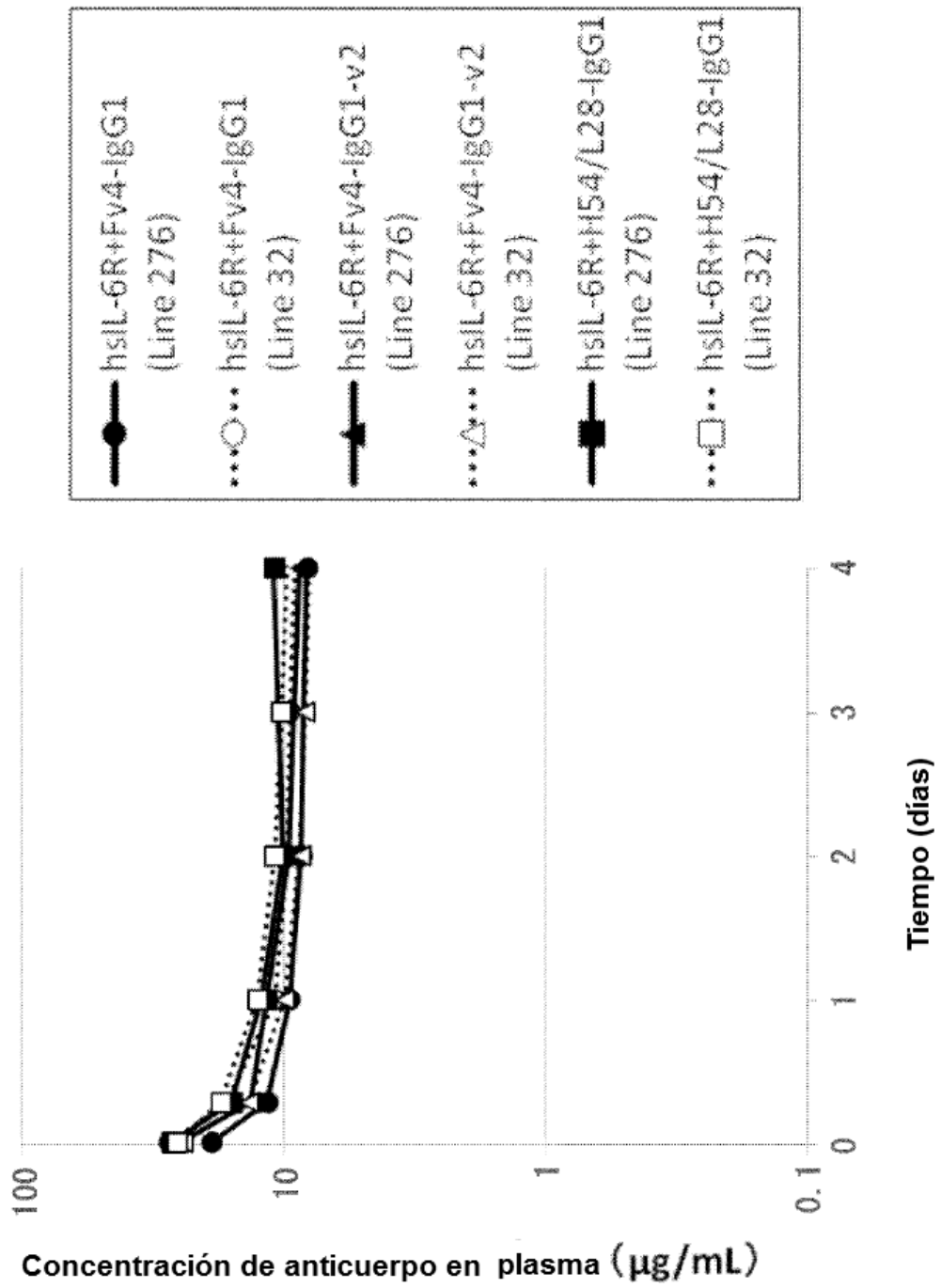
[Fig. 18]


hsIL-6R+Fv4-IgG1 (1 mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14 (1 mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14 (0.2 mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14 (0.01 mg/kg)
hsIL-6R
Límite de detección
100
10
1.56
0
7
14
Tiempo (días)
Concentración de hsIL-6R en plasma (ng/ml)

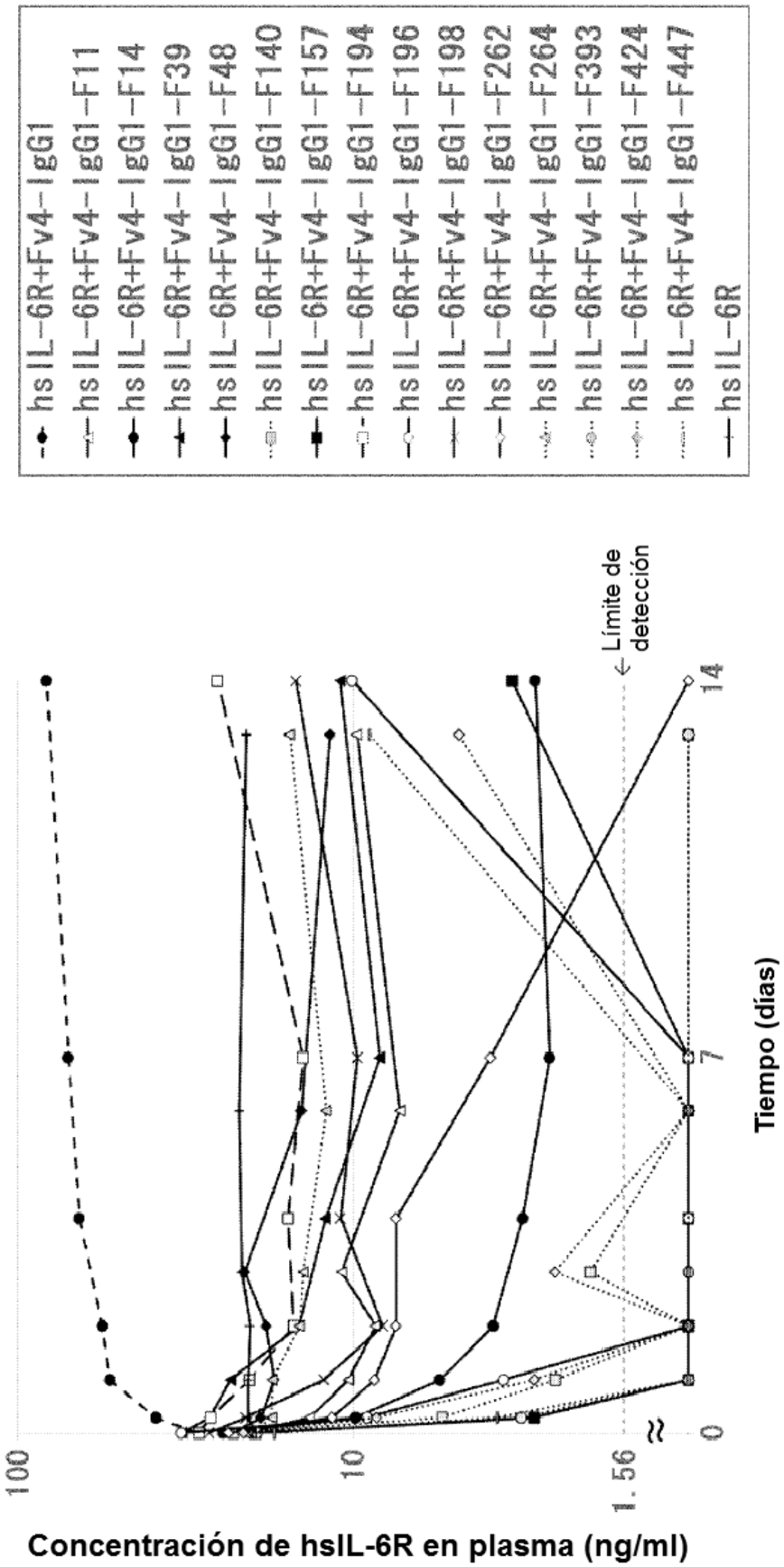
[Fig. 19]


hsIL-6R+Fv4-IgG1 (Line 276)
hsIL-6R+Fv4-IgG1 (Line 32)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2 (Line 276)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2 (Line 32)
hsIL-6R+H54/L28-IgG1 (Line 276)
hsIL-6R+H54/L28-IgG1 (Line 32)
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
Tiempo (días)
Concentración de hsIL-6R en plasma (ng/ml)

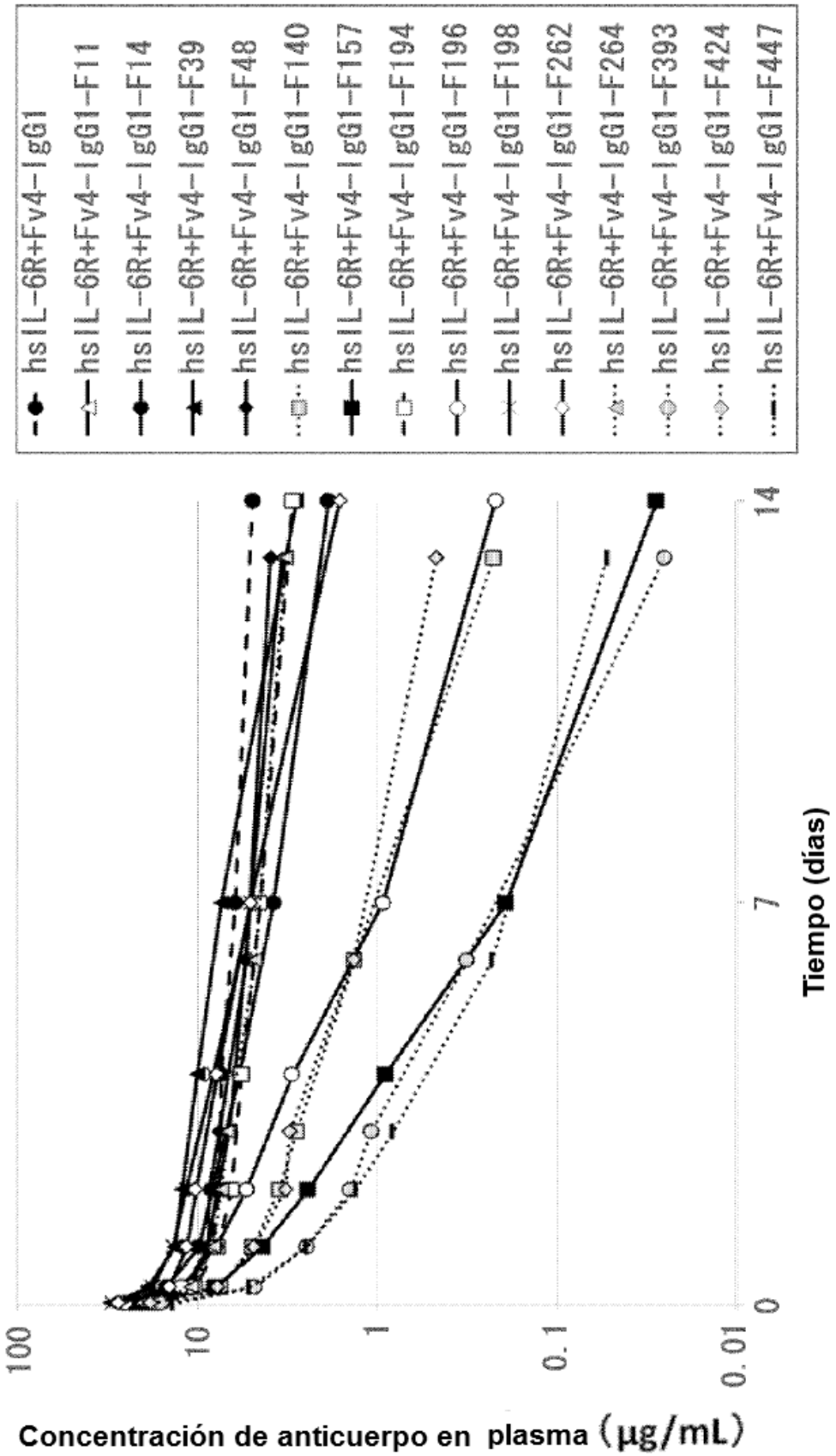
[Fig. 20]


hsIL-6R+Fv4-IgG1 (Line 276)
hsIL-6R+Fv4-IgG1 (Line 32)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2 (Line 276)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2 (Line 32)
hsIL-6R+H54/L28-IgG1 (Line 276)
hsIL-6R+H54/L28-IgG1 (Line 32)
100
10
1
0.1
0
1
2
3
4
Tiempo (días)
Concentración de anticuerpo en plasma (μg/mL)

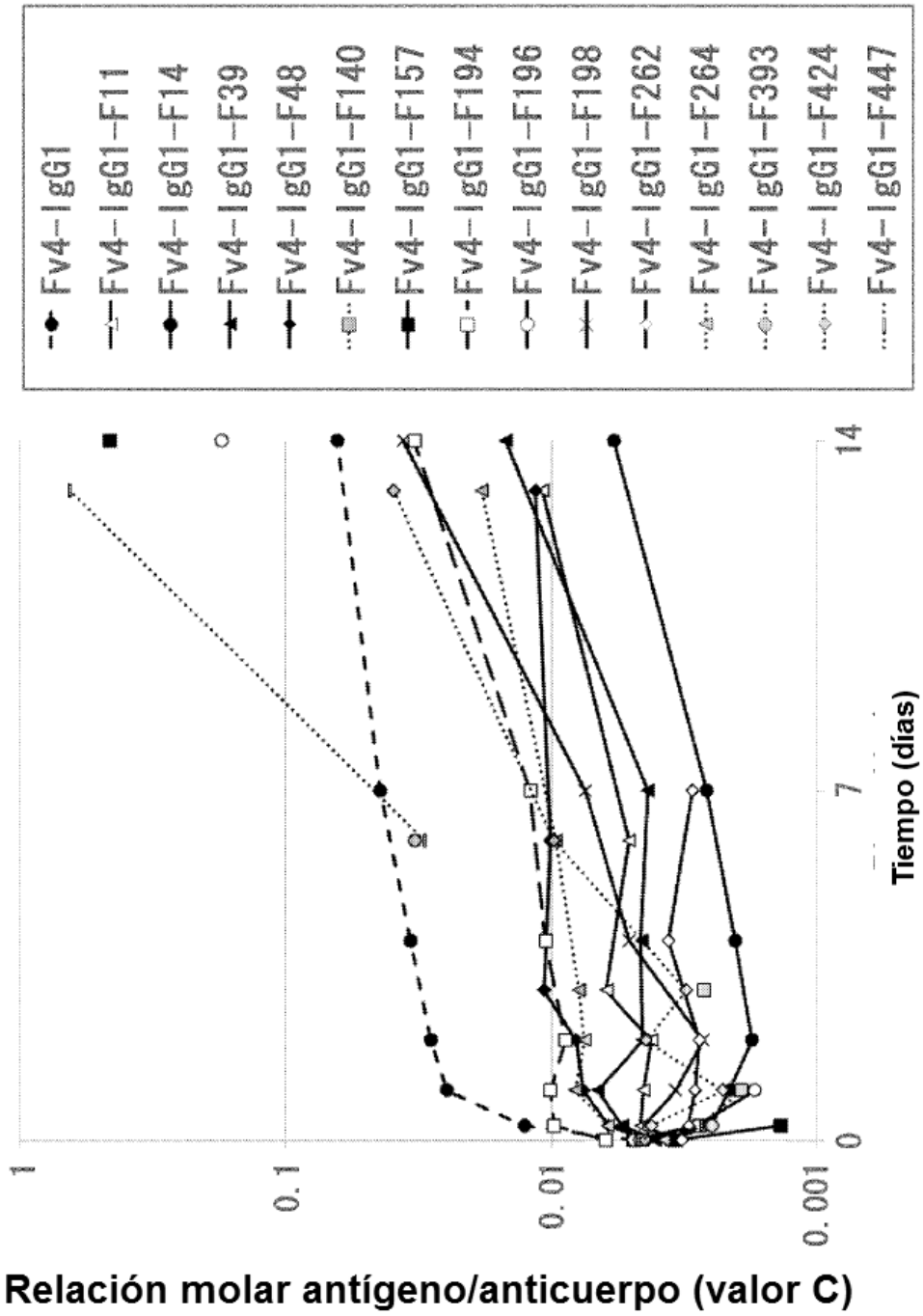
[Fig. 21]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F140
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F194
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F198
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F393
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F424
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F447
hsIL-6R
Límite de detección
100
10
1.56
0
7
14
Tiempo (días)
Concentración de hsIL-6R en plasma (ng/ml)

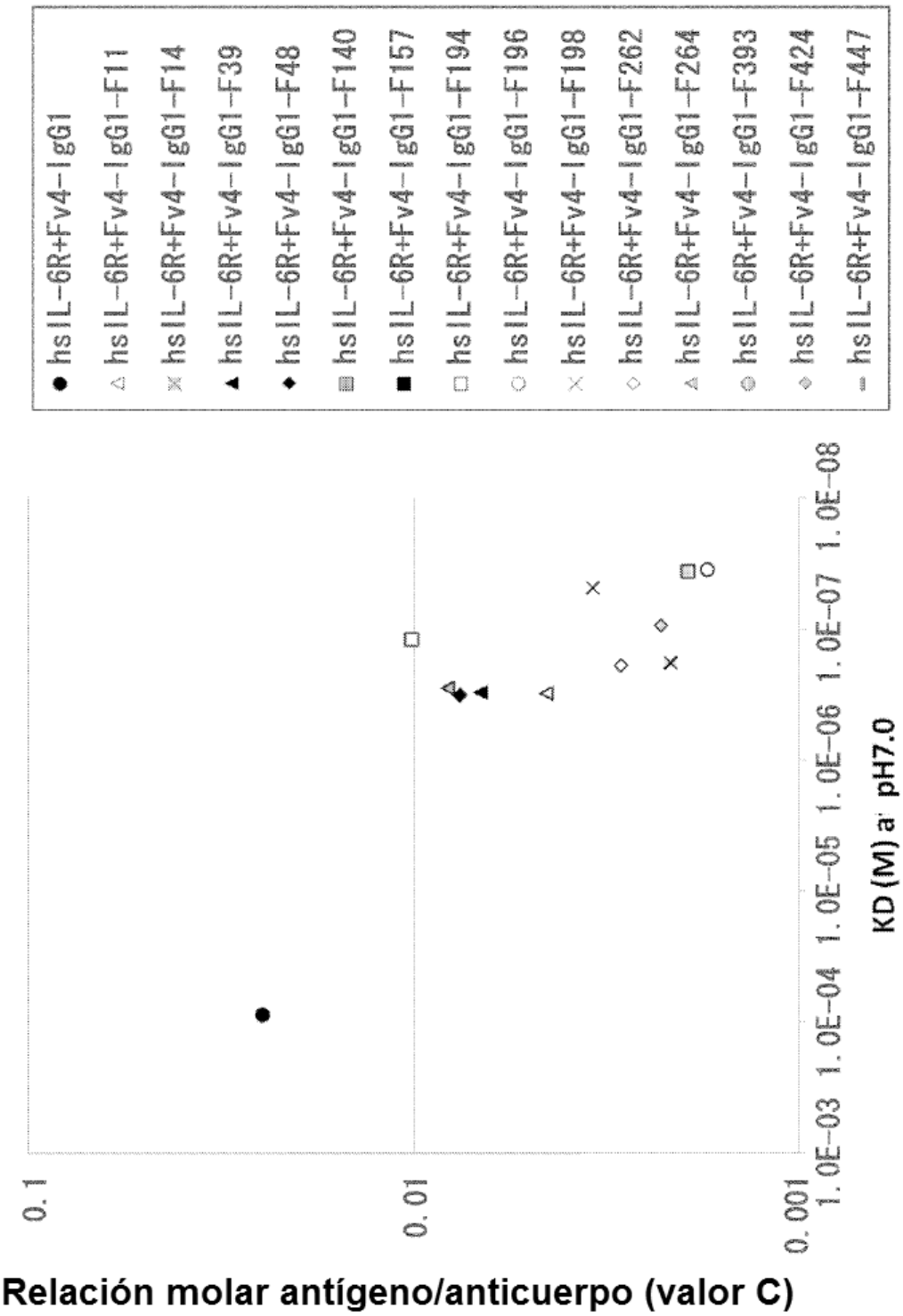
[Fig. 22]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F140
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F194
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F198
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F393
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F424
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F447
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
Tiempo (días)
Concentración de anticuerpo en plasma (μg/mL)

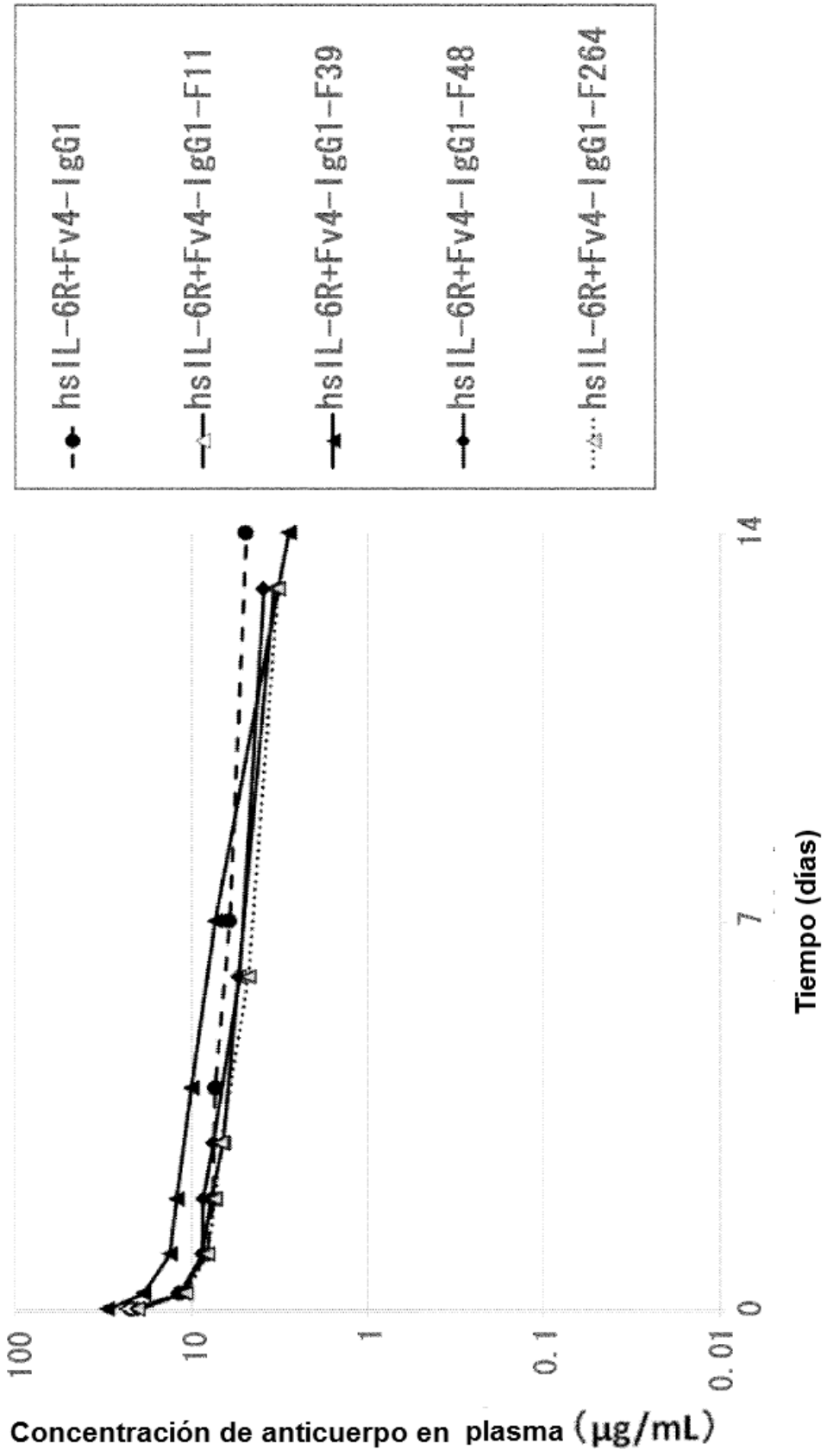
[Fig. 23]


Fv4-IgG1
Fv4-IgG1-F11
Fv4-IgG1-F14
Fv4-IgG1-F39
Fv4-IgG1-F48
Fv4-IgG1-F140
Fv4-IgG1-F157
Fv4-IgG1-F194
Fv4-IgG1-F196
Fv4-IgG1-F198
Fv4-IgG1-F262
Fv4-IgG1-F264
Fv4-IgG1-F393
Fv4-IgG1-F424
Fv4-IgG1-F447
1
0.1
0.01
0.001
0
7
14
Tiempo (días)
Relación molar antígeno/anticuerpo (valor C)

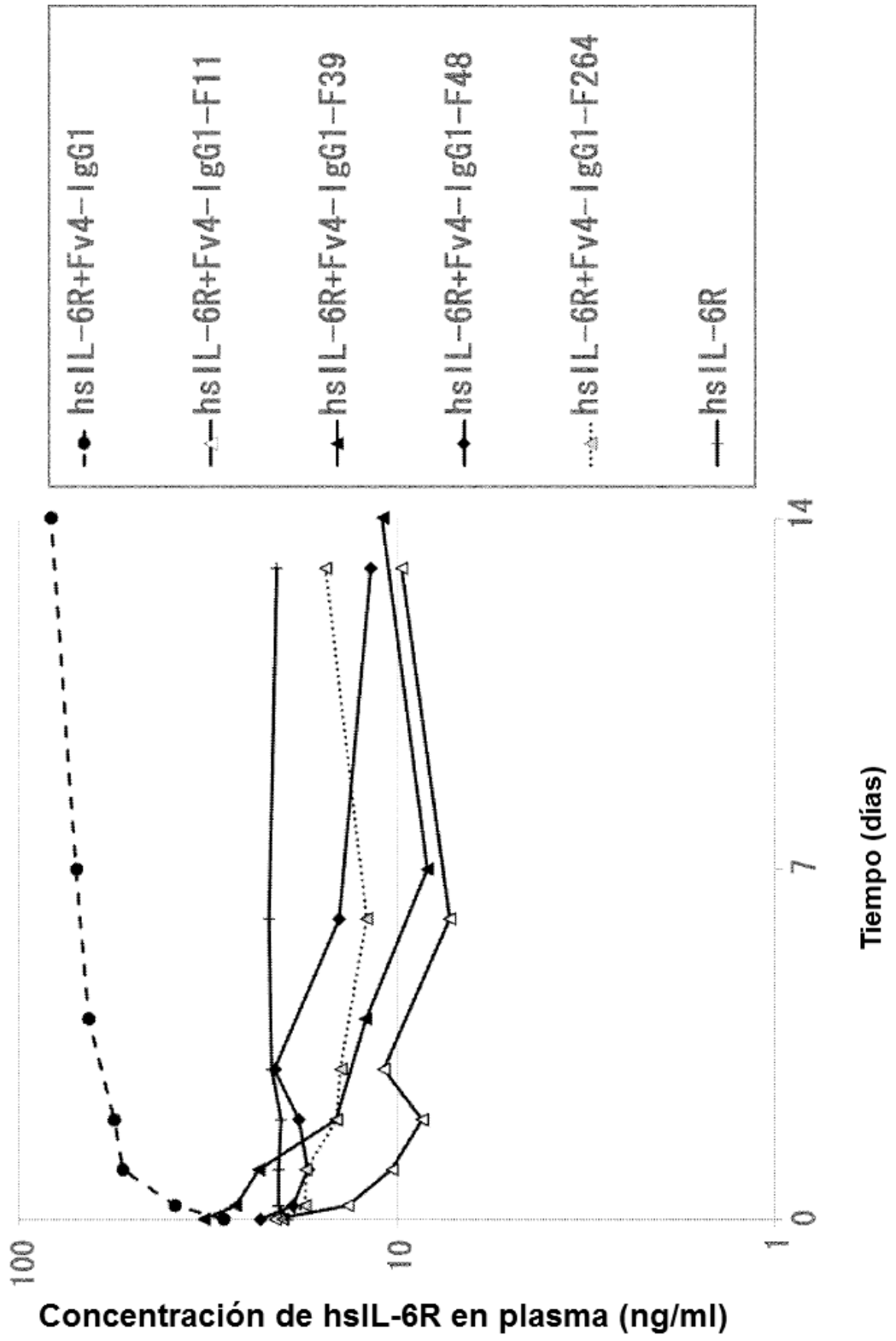
[Fig. 24]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F140
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F194
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F198
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F393
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F424
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F447
0.1
0.01
0.001
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
1.0E-07
1.0E-08
KD (M) at pH7.0
Relación molar antígeno/anticuerpo (valor C)

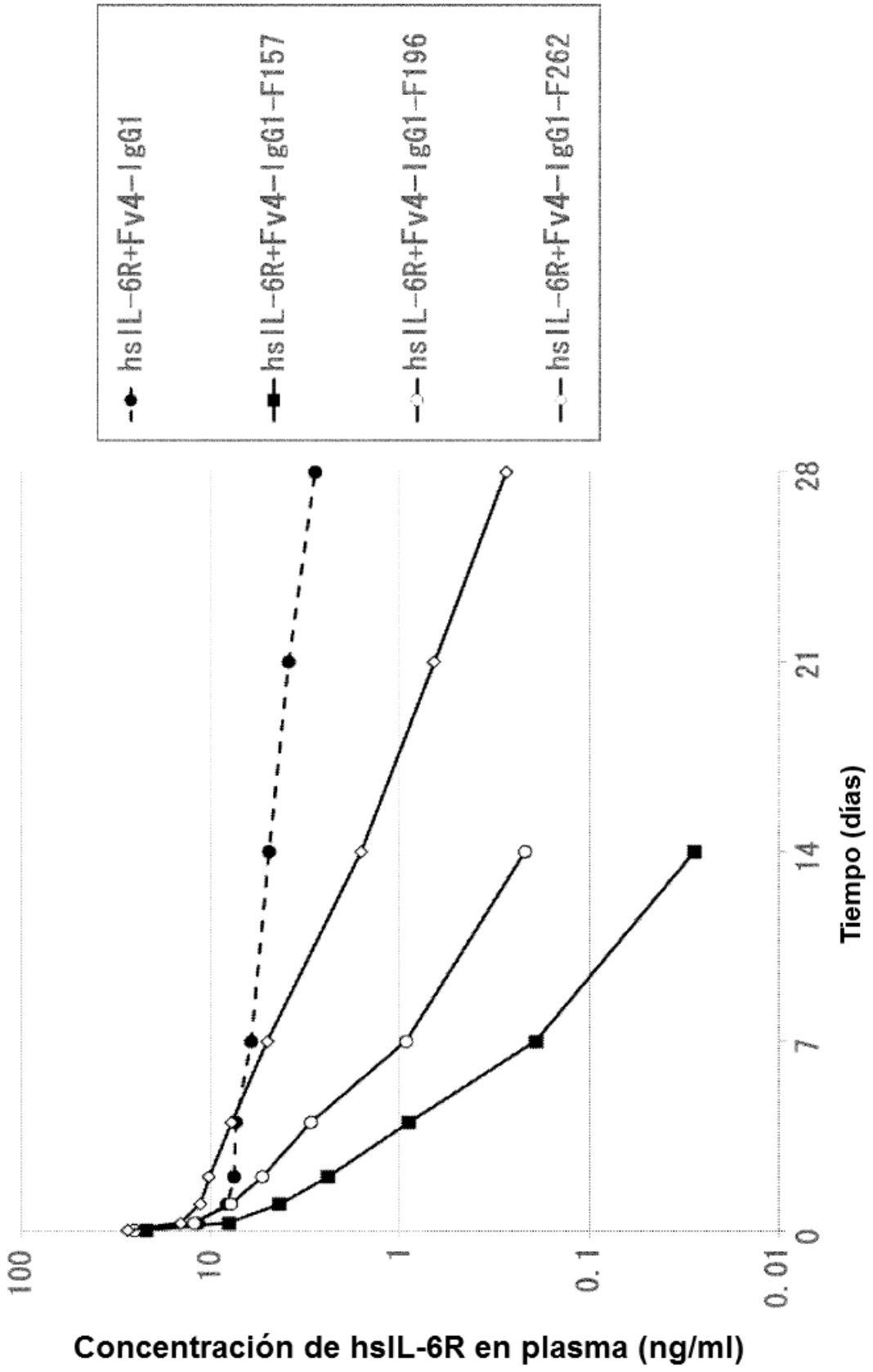
[Fig. 25]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
Tiempo (días)
Concentración de anticuerpo en plasma (μg/mL)

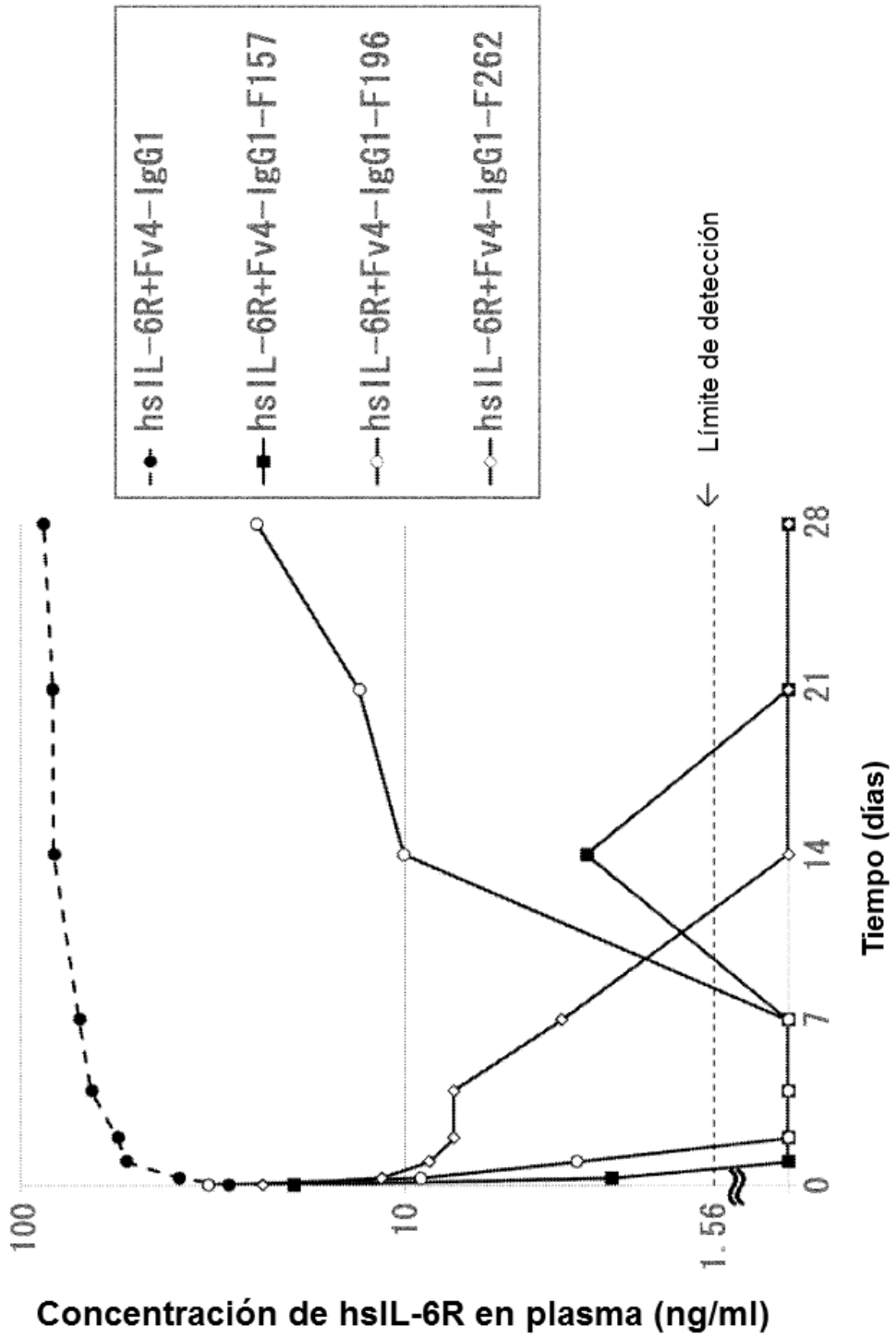
[Fig. 26]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R
100
10
1
0
7
14
Concentración de hsIL-6R en plasma (ng/ml)
Tiempo (días)

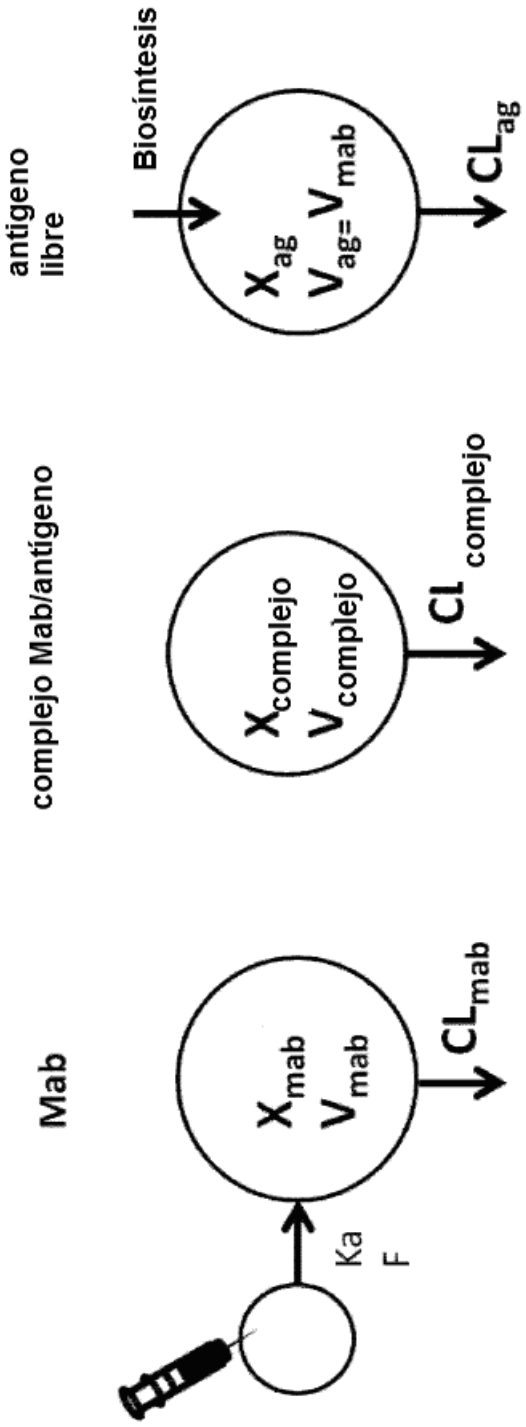
[Fig. 27]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
21
28
Tiempo (días)
Concentración de hsIL-6R en plasma (ng/ml)

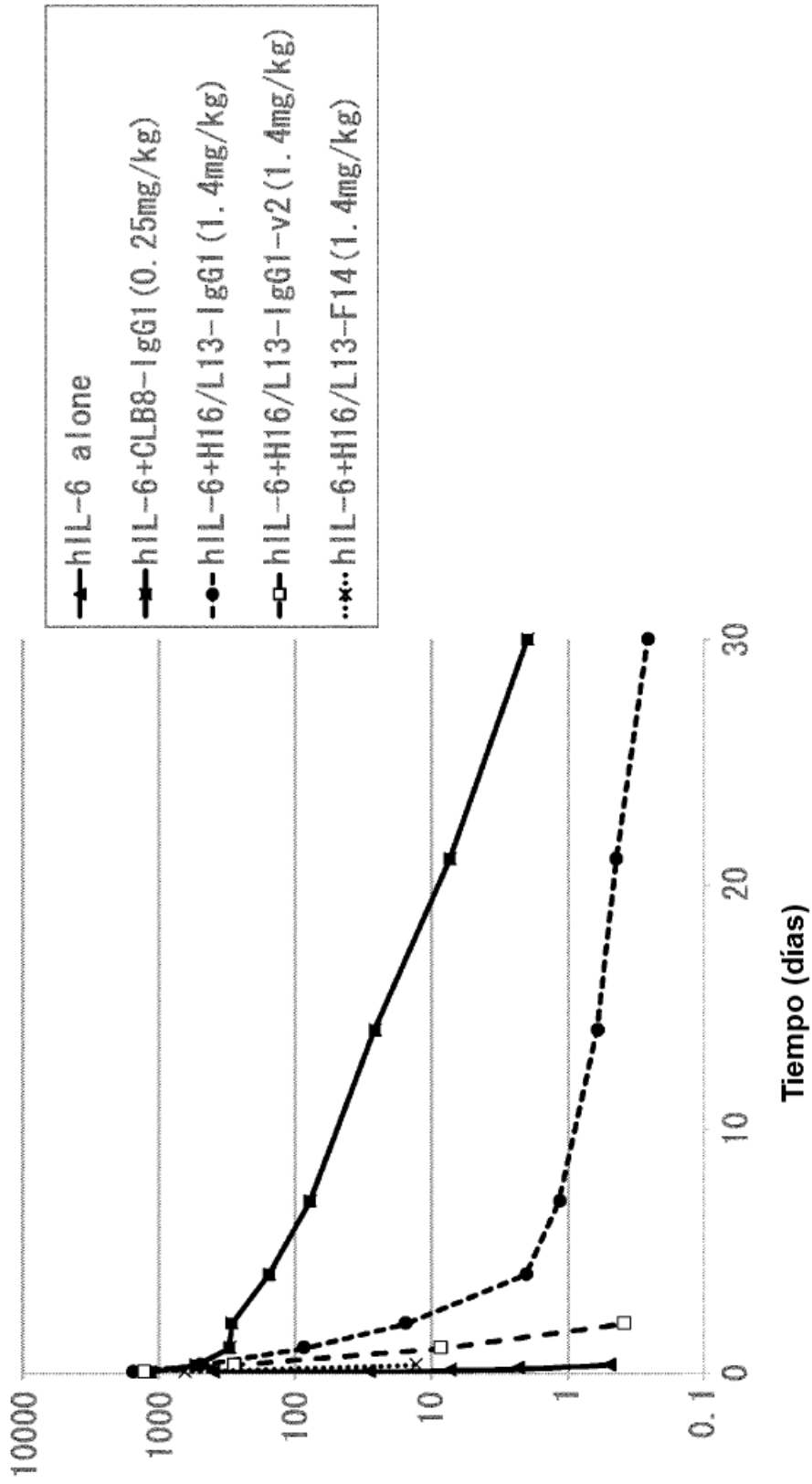
[Fig. 28]


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
Límite de detección
100
10
1.56
0
7
14
21
28
Tiempo (días)
Concentración de hsIL-6R en plasma (ng/ml)

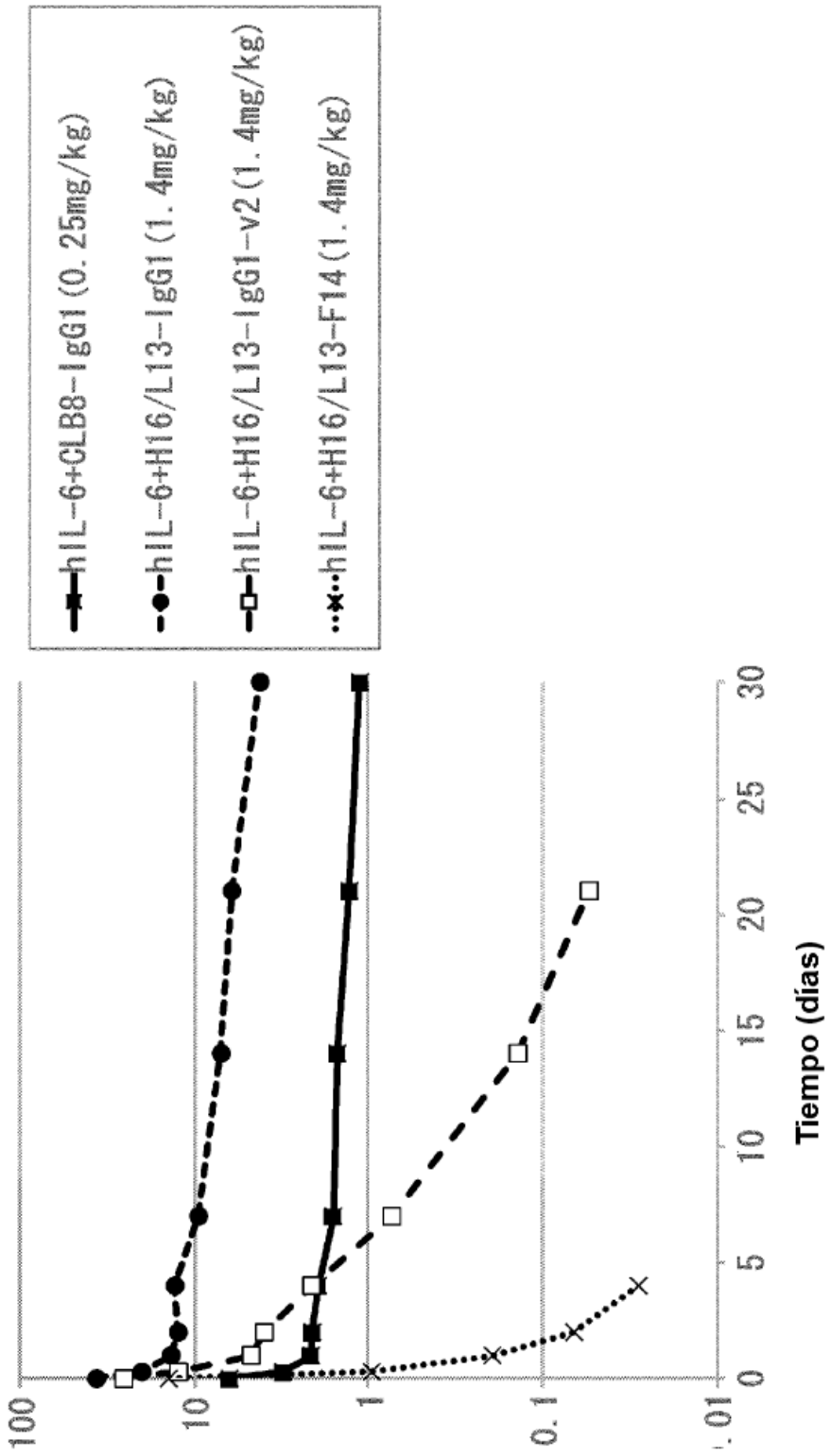
[Fig. 29]


antigeno libre
Biosíntesis
X_{ag} $V_{ag}=V_{mab}$
CL_{ag}
complejo Mab/antígeno
$X_{complejo}$ $V_{complejo}$
$Cl_{complejo}$
Mab
X_{mab} V_{mab}
CL_{mab}
Ka
F

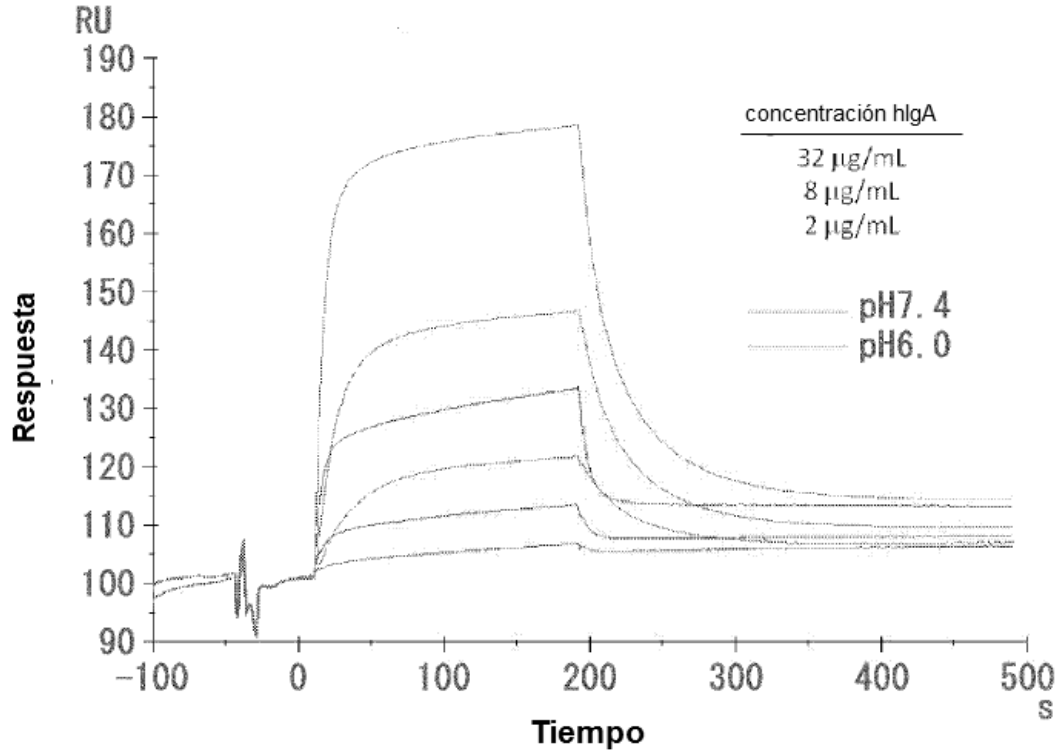
[Fig. 30]


hIL-6 alone
hIL-6+CLB8-IgG1 (0.25mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1 (1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1-v2 (1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-F14 (1.4mg/kg)
10000
1000
100
10
1
0.1
0
10
20
30
Tiempo (días)
Conc. hIL-6 total plasmática en ratón normal (ng/ml)

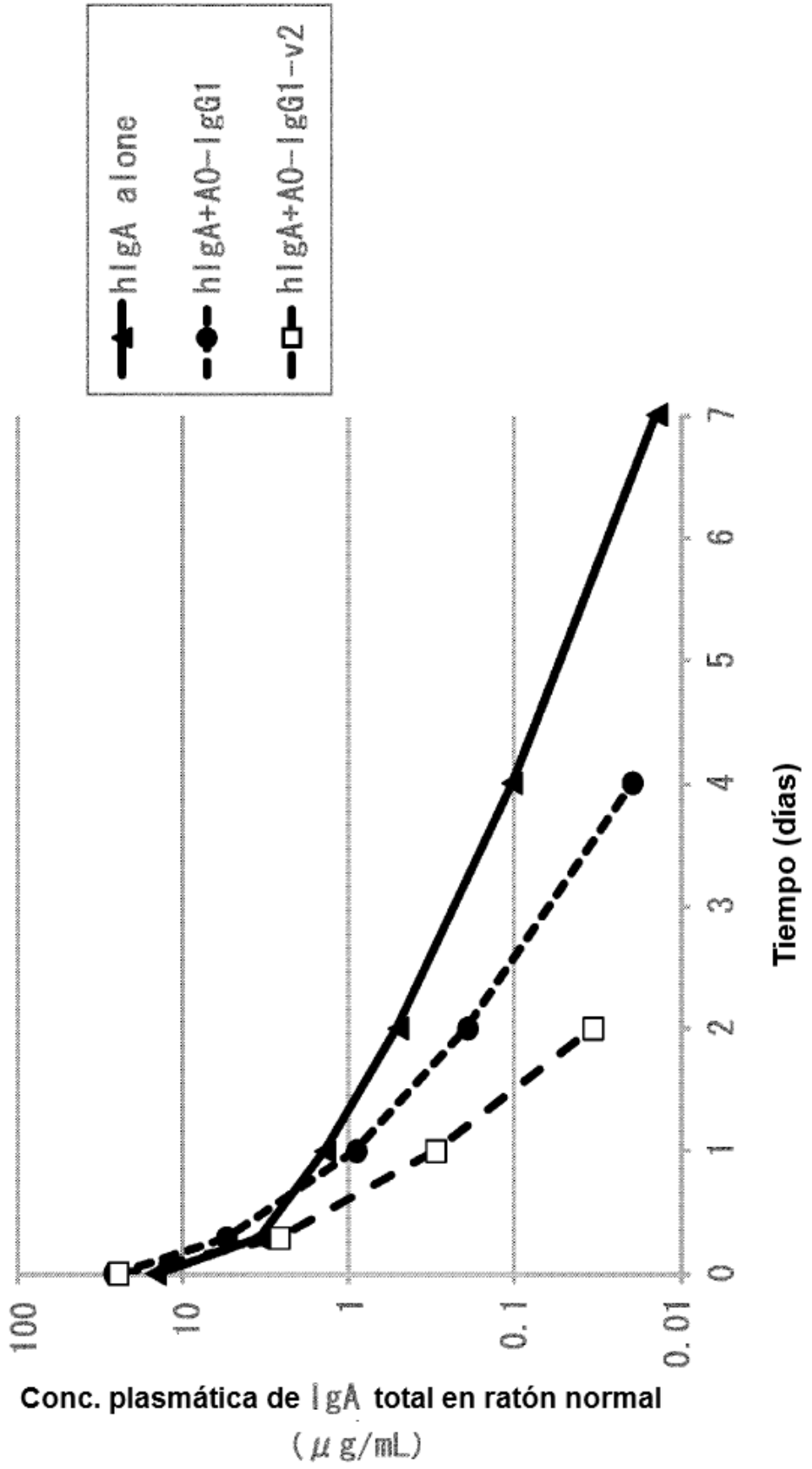
[Fig. 31]


hIL-6+CLB8-IgG1 (0.25mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1 (1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1-v2 (1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-F14 (1.4mg/kg)
100
10
1
0.1
.01
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo (días)
Conc. plasmática de Ab total en ratón normal
(μg/mL)

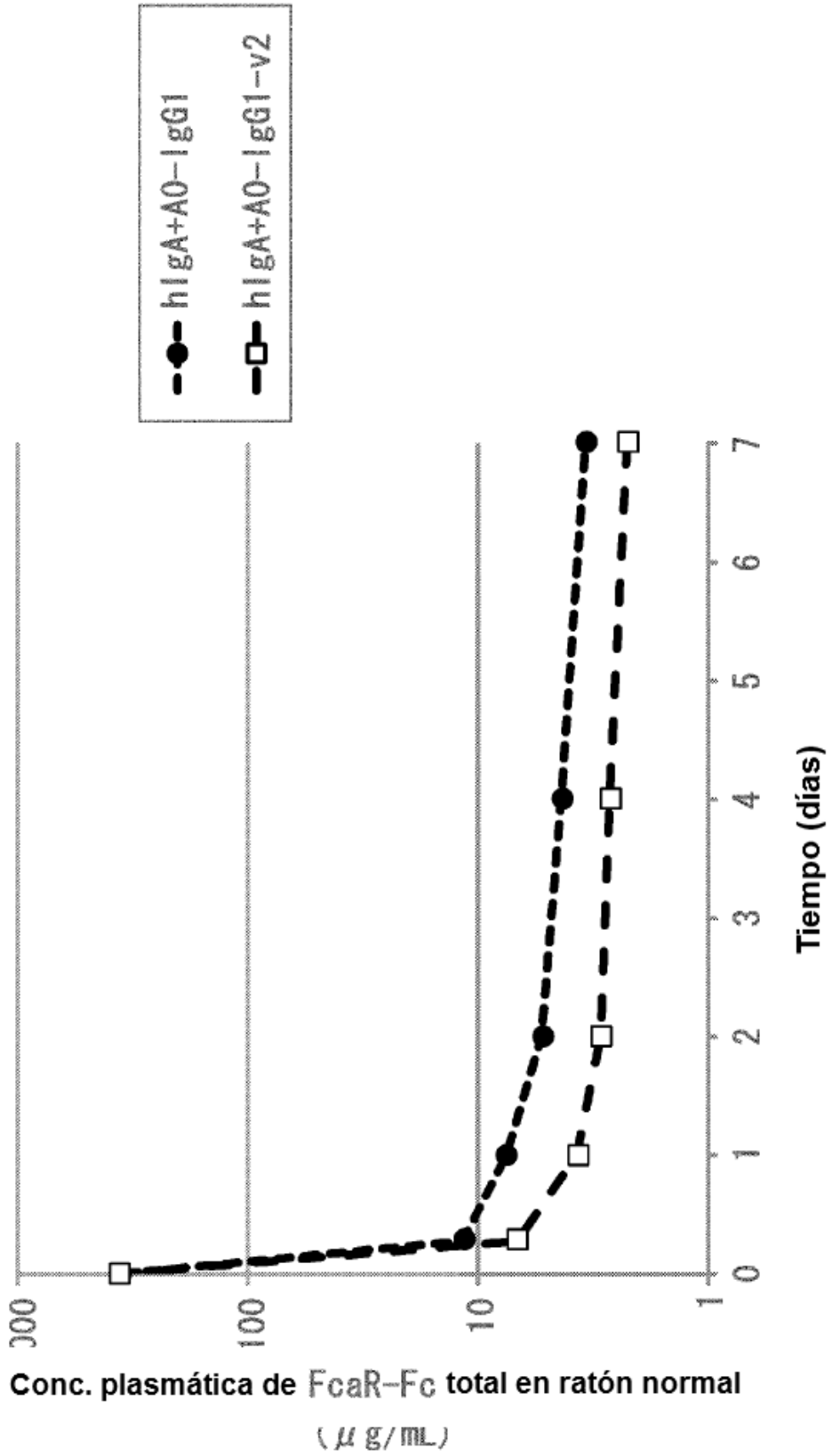
[Fig. 32]


RU
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
Respuesta
−100
0
100
200
300
400
500
s
Tiempo
concentración hIgA
32 µg/mL
8 µg/mL
2 µg/mL
pH7. 4
pH6. 0

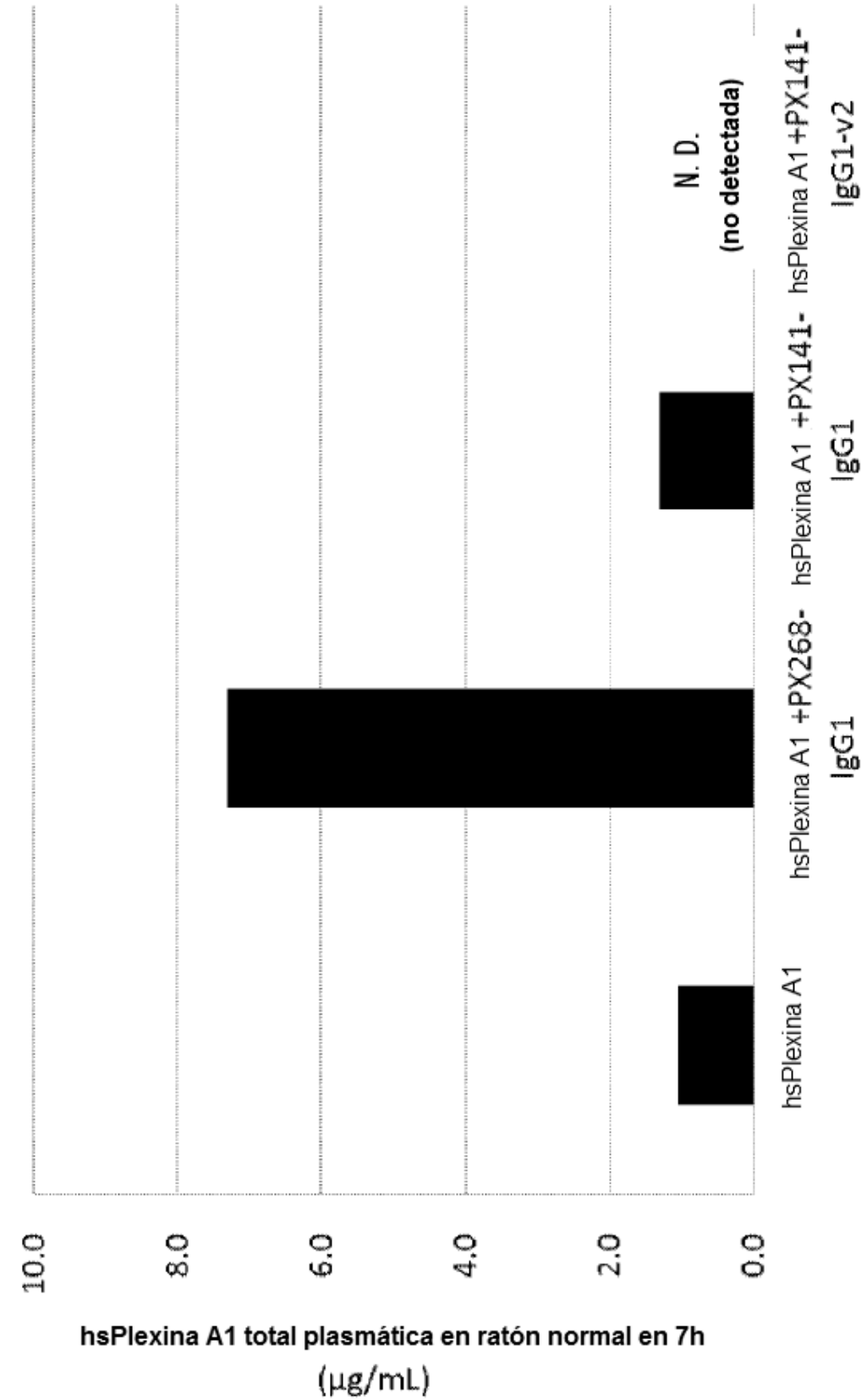
[Fig. 33]


hIgA alone
hIgA+AO-IgG1
hIgA+AO-IgG1-v2
100
10
1
0.1
0.01
0
1
2
3
4
5
6
7
Tiempo (días)
Conc. plasmática de IgA total en ratón normal
(μg/mL)

[Fig. 34]


hIgA+AO-IgG1
hIgA+AO-IgG1-v2
300
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
Tiempo (días)
Conc. plasmática de FcaR-Fc total en ratón normal
(μg/mL)

[Fig. 35]


10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
hsPlexina A1
hsPlexina A1 +PX268-IgG1
hsPlexina A1 +PX141-IgG1
N. D. (no detectada)
hsPlexina A1 +PX141-IgG1-v2
hsPlexina A1 total plasmática en ratón normal en 7h
(µg/mL)