

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 591**

51 Int. Cl.:

A01K 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2014 PCT/EP2014/052944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14125082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2014 E 14705493 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2956002**

54 Título: **Modelo animal farmacocinético**

30 Prioridad:

16.02.2013 EP 1315554

15.08.2013 EP 13180587

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

04.01.2018

73 Titular/es:

ALBUMEDIX A/S (100.0%)

Lottenborgvej 26

2880 Kgs. Lyngby, DK

72 Inventor/es:

CAMERON, JASON;

SLEEP, DARRELL;

SANDLIE, INGER y

ANDERSEN, JAN TERJE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 648 591 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modelo animal farmacocinético

5 Referencia al listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en la forma legible por ordenador.

10 CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere a un método de la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una variante de albúmina de suero humano (incluida la albúmina modificada tales como fusiones genéticas, conjugados y asociados) utilizando un conejo transgénico doble o roedor transgénico doble. La presente invención también se refiere a modelos animales que son especialmente adecuados para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de las variantes de albúmina de suero humano o modificaciones de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 [0003] La albúmina es una proteína que se encuentra de forma natural en el plasma sanguíneo de mamíferos donde es la proteína más abundante. Tiene funciones importantes en el mantenimiento de la presión osmótica deseada de la sangre y también en el transporte de varias sustancias en el flujo sanguíneo.

25 [0004] El receptor de Fc neonatal (FcRn) "Brambell" es una molécula bifuncional que contribuye a mantener un alto nivel de inmunoglobulinas de isotipo G (IgGs) y albúmina en el suero en mamíferos tales como seres humanos. FcRn ha sido descubierto para recuperar la albúmina e IgG de la degradación intracelular por un mecanismo dependiente de pH así prolongando su vida media en el suero. Se ha descubierto que la vida media en el plasma de la albúmina de suero humano (HSA) tipo salvaje es de aproximadamente 19 días.

30 [0005] El uso de albúmina en la administración de fármacos está bien descrito. Agentes activos terapéuticos pueden por ejemplo ser conjugados con albúmina (WO 2000/69902) o polipéptidos activos terapéuticos se pueden fusionar genéticamente a la albúmina y expresarse como proteínas quiméricas (WO 2001/79271 y WO 2003/59934) o agentes activos terapéuticos pequeños ácidos o hidrofóbicos pueden asociarse reversiblemente a la albúmina (Kragh-Hansen et al, 2002, Biol. Pharm. Bull. 25,695 y WO 2000/71079). La unión reversible a la albúmina puede también ser conseguida para compuestos beneficiosos farmacéuticamente, que tienen pocas o ningunas propiedades de adhesión de albúmina por la asociación de tales compuestos a una fracción que tiene propiedades de unión de albúmina (Kurtzhals et al, 1997, J. Pharm. Sci. 86: 1365, y WO 2010/065950). Kratz, 2008, J. Controlled Release 132,171-183 proporciona una revisión de todas estas tecnologías. Los beneficios del uso de albúmina para administración de fármacos son vida media más larga y/o liberación controlada de un agente terapéutico y/o destino hacia tejidos u órganos selectivos.

45 [0006] Un número de variantes de albúmina natural se han descrito. Otagiri et al, 2009, Biol. Pharm. Bull. 32(4), 527-534, divulga 77 variantes de albúmina conocidas, 22 se encuentran en el dominio I, 30 en el dominio II y 25 se encuentran en el dominio III. Se ha identificado un número de otras variantes naturales y algunas de estas han sido analizadas para unión de FcRn (Andersen et al (2010), Clinical Biochemistry 43,367-372; Galliano et al (1993) Biochim. Biophys. Acta 1225,27-32; Minchiotti et al (1987) Biochim. Biophys. Acta 916,411-418; Takahashi et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,4413-4417; Carlson et al (1992). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89,8225- 8229; (Peach, R. J. y Brennan, S. O., (1991) Biochim Biophys Acta.1097:49-54). La vida media de variantes de albúmina humana de origen natural que utilizan un modelo de ratón fue descrita en lwao, et. al. (2007) B.B.A. Proteins and Proteomics 1774,1582-1590. Además, una serie de variantes de albúmina hechas por el hombre con unión alterada al FcRn ha sido descrita en WO 2011/051489; WO2011/124718, WO 2012/059486, WO 2012/150319 WO 2011/103076, y WO 2012/112188, ninguna de estas publicaciones revela datos sobre las mediciones de la vida media de la variante de albúmina en modelos animales.

60 [0007] Los animales son frecuentemente usados en el desarrollo preclínico para predecir la farmacocinética de los agentes terapéuticos en seres humanos antes de la primera administración en el hombre. Para asistir en estas predicciones, se usan frecuentemente animales de diferentes tamaños y peso. La clasificación alométrica de interespecies se basa en la suposición de que hay similitudes anatómicas fisiológicas y bioquímicas entre animales que pueden ser descritas por modelos matemáticos simples. Un número de especies de animales se ha usado exitosamente en la clasificación alométrica de interespecies incluyendo el ratón, rata, cobaya, conejo, macaco cangrejero, babuino, macaco rhesus, perro, cerdo y oveja (Mahmood I. (2004) New Drug Development, Regulatory Paradigms for Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics, editado por Chandrahas G. Sahajwalla, Informa Healthcare, páginas 137-163, ISBN impreso: 978-0-8247-5465-5). Los cerdos son un modelo aceptado para moléculas pequeñas (Hall C. et al. (2012) J. Pharma Sci.

101,1221-1241) y proteínas (Larsen M. O. y Rolin B. (2004) *ILAR Journal* 45, 303-313; Zheng Y. et al. (2012) *mAbs* 4, 243-255). De hecho el minicerdo Göttingen está ganando importancia como un gran modelo animal en la investigación farmacéutica debido a sus similitudes fisiológicas y anatómicas con los humanos y está sustituyendo a perros y primates no humanos en estudios preclínicos (Suenderhauf C. y Parrott N. (2013) *Pharm. Res.* 30,1-15).

[0008] El único modelo animal no primate disponible actualmente para evaluar la prueba del concepto de que las variantes mejoradas de HSA de unión a FcRn tendrán una vida media extendida son los ratones transgénicos de FcRn humano (homocigoto knock-out (KO) del gen de ratón y un heterocigoto knock-in (KI) del gen humano) (Roopenian et al (2003) *J. Immunol.* Vol 170, págs. 3528-3533). Este modelo, sin embargo, tiene limitaciones importantes desde el punto de vista de medir la vida media de HSA puesto que el ratón contiene una alta concentración circulante de albúmina de suero de ratón que se enlaza a FcRn humano con una afinidad 6 veces superior que HSA tipo salvaje (Andersen J.T. (2010) *J Biol. Chem.* 12,285(7): 4826-36).

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009]

La Figura 1 muestra la unión de variantes de albúmina para shFcRn. Diluciones en serie de cada variante de albúmina (10 μ M - 0.3 μ M) fueron inyectadas sobre shFcRn inmovilizado a pH 6.0. (A) HSA tipo salvaje, (B) HSA K573P, (C) HSA K573F, (D) HSA K573W, (E) HSA K573H y (F) HSA K573Y.

La Figura 2 muestra la unión de variantes de albúmina a FcRn soluble de rata (srFcRn). Diluciones en serie de cada variante de albúmina (10 μ M-0.3 μ M) fueron inyectadas sobre srFcRn inmovilizado a pH 6.0. (A) HSA tipo salvaje, (B) albúmina de suero de rata tipo salvaje (RSA); (C) HSA K573P, (D) HSA K573F, (E) HSA K573W, (F) HSA K573H y (G) HSA K573Y.

La Figura 3 muestra la unión de variantes de albúmina a albúmina soluble de suero de ratón (smFcRn). Diluciones en serie de cada variante de albúmina (10 μ M-0.3 μ M) fueron inyectadas sobre smFcRn inmovilizado a pH 6.0, con la excepción de HSA tipo salvaje (100 μ M-3.0 μ M). (A) HSA tipo salvaje, (B) MSA, (C) RSA, (D) HSA K573P, (E) HSA K573F, (F) HSA K573W, (G) HSA K573H y (H) HSA K573Y.

La Figura 4 muestra la unión de variantes de albúmina a FcRn soluble de macaco rhesus (srmFcRn). Diluciones en serie de cada variante de albúmina (10 μ M-0.3 μ M) fueron inyectadas sobre srmFcRn inmovilizado a pH 6.0. (A) albúmina de suero de tipo salvaje de macaco rhesus (rmSA); (B) MSA, (C) RSA, (D) HSA K573P, (E) HSA K573F, (F) HSA K573W, (G) HSA K573H, (H) HSA K573Y y (I) HSA tipo salvaje.

La Figura 5 muestra la unión de variantes de albúmina a FcRn soluble de perro (dFcRn). Diluciones en serie de variantes de albúmina inyectadas sobre FcRn soluble inmovilizado de perro a pH 6.0. (A) albúmina tipo salvaje de suero de perro (DSA) (B) HSA, (C) HSA K500A (D) HSA K573P, (E) HSA K573W, (F) HSA K573F, (G) HSA K573Y y (H) HSA K573H (I) rmSA, (J) albúmina de suero de cerdo tipo salvaje (PSA); (K) RSA, (L) MSA.

La Figura 6 muestra la unión de variantes de albúmina a FcRn soluble de cerdo (pFcRn). Diluciones en serie de variantes de albúmina inyectadas sobre FcRn soluble inmovilizado de cerdo a pH 6.0. (A) PSA (B) HSA, (C) HSA K500A (D) HSA K573P, (E) HSA K573W, (F) HSA K573F, (G) HSA K573Y y (H) HSA K573H (I) rmSA, (J) DSA, (K) RSA, (L) MSA.

La Figura 7 muestra áreas seleccionadas de un alineamiento de ClustalW de FcRn HC de (humano, macaco, vaca, cabra, oveja, camello, cerdo, perro, cobaya, conejo, rata y ratón). Los residuos de aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias se indican por (*), Las sustituciones conservadas se indican por (:), y las sustituciones semiconservadas se indican por (.). V52 Y H161 de SEQ ID N.º: 16 se subrayan en negrita. Los parámetros de alineamiento fueron penalización 10 para gaps de apertura y terminales, penalización 0.5 para gaps de extensión y de separación usando la matriz de puntuación Blosum.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0010] La presente invención proporciona un método para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una albúmina de suero humano (HSA) variante en comparación con HSA tipo salvaje. Las propiedades farmacocinéticas de moléculas donde HSA tipo salvaje y HSA variante se modifica por fusión, conjugación o asociación con un socio tal como agentes terapéuticos, vacunas o agentes de diagnóstico son de interés particular.

[0011] Una ventaja de la presente invención es que esta reduce la necesidad de modelos animales de primates para el cribado de albúmina que contiene fármacos mediante un modelo de animal no primate que puede producir perfiles de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas que pueden ser extrapoladas de forma razonable para indicar en qué se pueden parecer los perfiles farmacocinéticos humanos.

[0012] El modelo animal usado en el método de la presente invención se caracteriza por que la afinidad de unión de HSA tipo salvaje al FcRn nativo de dicho animal es el mismo que o superior a la afinidad de unión de la albúmina nativa de dicho animal.

65 Definiciones

[0013] El término "afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza del total de la suma de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, IgG o albúmina) y su socio de unión (por ejemplo, un antígeno o FcRn). A menos que se indique lo contrario, como se utiliza en este caso, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, albúmina y FcRn). La afinidad de una molécula (X) con su socio (Y) puede generalmente ser representada por la constante de disociación de equilibrio (K_D), que se calcula como la proporción K_{off}/K_{on} (K_d/K_a). La afinidad de unión se puede medir por métodos conocidos en la técnica. Un método preferido es la resonancia de plasmón de superficie (SPR) por ejemplo usando un instrumento Biacore (GE Healthcare) como se ejemplifica aquí. La afinidad de unión de pares endógenos de FcRn y albúmina (por ejemplo HSA a hFcRn, albúmina de perro a FcRn de perro, etcétera) generalmente varían de 0.2 a 3.2 micro Molar)

[0014] El término "modificado" o "modificación" en relación con la albúmina se refiere a cambiar la albúmina añadiendo o borrando moléculas no relacionadas con la secuencia de aminoácidos de la albúmina, por ejemplo eliminando ácidos grasos o añadiendo una molécula de un socio. La albúmina puede en particular ser modificada por conjugación, fusión o asociación de un socio. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de la albúmina (por ejemplo SEQ ID N.º: 2) se denominan variantes y no se consideran modificaciones.

[0015] El término "conjugado" o "conjugación" en relación con albúmina se refiere a HSA tipo salvaje o una HSA variante o un fragmento de la misma que se conjuga a un socio de conjugación tal como un agente beneficioso, por ejemplo un agente terapéutico y/o agente de diagnóstico. La conjugación puede hacerse en el extremo N y/o extremo C de la albúmina, pero puede alternativamente o además hacerse en una o más (diferentes) posiciones adecuadas del aminoácido en la albúmina. En particular los residuos de cisteína que no están implicados en enlaces de disulfuro son adecuados para la conjugación. WO 2010/092135 describe una albúmina variante con residuos de cisteína adicionales adecuados para la conjugación. Técnicas para la conjugación de un socio de conjugación a una albúmina o fragmento de la misma se conocen en la técnica. WO 2009/019314 divulga ejemplos de técnicas adecuadas para la conjugación de un socio de conjugación, por ejemplo, un agente terapéutico, a un polipéptido cuyas técnicas también pueden ser aplicadas a la presente invención. Además, las páginas 37 a 44 de WO 2009/019314 revelan ejemplos de compuestos y fracciones que se pueden conjugar con la transferrina y estos compuestos y fracciones también se pueden conjugar con una variante de albúmina de la presente invención.

[0016] El término "fusionado" o "fusión" en relación con la albúmina se refiere a HSA tipo salvaje o una HSA variante o un fragmento de la misma que se fusiona genéticamente con un socio de fusión tal como un agente beneficioso por ejemplo un polipéptido terapéutico y/o polipéptido de diagnóstico. Las fusiones se hacen normalmente en el extremo N o extremo C de la albúmina, o a veces en ambas extremidades. Las fusiones pueden en principio, de forma alternativa o adicional hacerse en la molécula de albúmina, en este caso se prefiere localizar el socio de fusión entre los dominios de albúmina. Por ejemplo, un socio de fusión se puede situar entre dominio I y dominio II y/o entre dominio II y dominio III. Instrucciones con respecto a fusiones de albúmina o un fragmento de la misma se conocen en la técnica y la persona experta apreciará que tales instrucciones también pueden ser aplicadas a la presente invención. Tabla 1 de WO 2001/79271, tabla 1 (página 11) de WO 2001/79258, tabla 1 (página 11) de WO 2001/79442, tabla 1 (página 12) de WO 2001/79443, tabla 1 (página 11) de WO 2001/79443, tabla 1 de WO 2003/060071, tabla 1 de WO 2003/59934, tabla 1 de WO 2005/003296, tabla 1 de WO 2007/021494 y tabla 1 de WO 2009/058322 contienen ejemplos de socios de fusión, por ejemplo polipéptidos terapéuticos, que se pueden fusionar con la albúmina o fragmentos de la misma, y estos ejemplos se aplican también a la presente invención.

[0017] El término "asociado", "asociar", o "asociación" con respecto a la albúmina se refiere a una composición que comprende HSA tipo salvaje o HSA variante o un fragmento de la misma y un socio de asociación, tal como un agente terapéutico y/o agente de diagnóstico, ligado o asociado a la albúmina o fragmento de la misma por unión no covalente. Un ejemplo de tal asociado es una albúmina y un lípido asociado a la albúmina por una interacción hidrofóbica. Tales asociados se conocen en la técnica y se pueden preparar utilizando técnicas bien conocidas. Las moléculas adecuadas para la asociación con albúmina se conocen en la técnica, preferiblemente son acídicas, lipofílicas y/o tienen características electronegativas. Ejemplos de tales moléculas se dan en la tabla 1 de Kragh-Hansen et al, 2002, Biol. Pharm. Bull. 25, 695. Además, WO 2000/71079 describe la asociación de albúmina con paclitaxel y paclitaxel se incluye en la presente invención.

[0018] El término "nativo" con respecto a la albúmina y FcRn se refiere a la albúmina o proteínas FcRn que son genéticamente expresadas en un animal específico. La albúmina nativa en un ratón es normalmente la albúmina de suero de ratón endógeno que corresponde con el número de registro de UniProt P07724. FcRn comprende una cadena pesada (HC) de FcRn y una microglobulina beta2 (beta2m). La FcRn nativa en un ratón es normalmente FcRn HC de ratón endógeno que corresponde con número de registro de UniProt Q61559 y beta2m de ratón con número de registro de UniProt Q91Z73. Una albúmina nativa o FcRn puede

sin embargo ser un gen transgénico que se integra en el genoma del animal de una manera estable y donde el gen correspondiente del animal ha sido desactivado. Un ejemplo es el ratón transgénico donde FcRn HC humano ha sido integrada en el genoma del ratón y el hFcRn HC de ratón ha sido desactivada (Roopenian et al. (2003) J. Immunol. Vol 170, págs. 3528-3533). En este animal el hFcRn HC humano sería considerado para formar parte del FcRn nativo del animal transgénico. El FcRn nativo también puede ser una variante de FcRn, bien de origen natural o una variante producida por intervención humana. Un ejemplo de tal variante es un FcRn de ratón (SEQ ID N.º: 13) con una o varias de las siguientes mutaciones M73V y E184H.

[0019] El término "tipo salvaje" (Wt) en relación con albúmina o FcRn significa una albúmina o FcRn que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la albúmina o FcRn naturalmente encontrada en un animal o en un humano (la secuencia de gen endógeno del animal o humano). Se entiende que albúmina tipo salvaje o FcRn tipo salvaje es sin alteraciones genéticas producidas por intervención humana por ejemplo por desactivación/activación de genes como en la producción de animales transgénicos. SEQ ID N.º: 2 es una albúmina tipo salvaje madura de Homo sapiens. Más albúminas tipo salvaje y moléculas de FcRn tipo salvaje se enumeran en las tablas 1 y 3.

[0020] El término "identidad de secuencias" describe la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de gaps de 10, penalización por extensión de gaps de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera: (residuos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento - número Total de gaps en el alineamiento).

[0021] El término "agente terapéutico", "compuesto terapéutico", "molécula terapéutica" o "medicamento" se usa de forma intercambiable y se refiere a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, o una macromolécula biológica (por ejemplo un péptido, proteína, lípido, ácido nucleico (por ejemplo ADN o ARN), virus) o una macromolécula biológica en asociación con un compuesto químico. Agentes terapéuticos incluyen agentes que pueden prevenir, mejorar o curar una condición médica. El agente terapéutico puede ser purificado, purificado sustancialmente o purificado parcialmente. Un "agente", según la presente invención, también incluye un agente de terapia de radiación y vacunas.

[0022] El término "variante de HSA" o "HSA variante" significa un polipéptido derivado a partir de una albúmina de suero humano que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o eliminación, en una o más (varias) posiciones. Una sustitución significa una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. La variante también puede ser un fragmento funcional de HSA. Los fragmentos pueden consistir en una secuencia ininterrumpida derivada de albúmina o puede comprender dos o más secuencias derivadas de distintas partes de la albúmina. Los fragmentos según la invención tienen un tamaño superior a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, preferiblemente más de 150 residuos de aminoácidos, más preferido más de 200 residuos de aminoácidos, más preferido más de 300 residuos de aminoácidos, aún más preferido más de 400 residuos de aminoácidos y más preferido más de 500 residuos de aminoácidos. En una forma de realización preferida un fragmento corresponde a uno o más (varios) de los dominios de albúmina. Dominios de albúmina preferidos de la invención son dominio I de HSA consistente en residuos de aminoácidos 1 a 194 ± 1 a 15 aminoácidos de SEQ ID N.º: 2; dominio II de HSA consistente en residuos de aminoácidos 192 a 387 ± 1 a 15 aminoácidos de SEQ ID N.º: 2 y dominio III de HSA consistente en residuos de aminoácidos 381 a 585 ± 1 a 15 aminoácidos de SEQ ID N.º: 2 o una combinación de uno o más (varios) de estos dominios, por ejemplo dominio I y II, dominio II y III o dominio I y III fusionados juntos. El polipéptido alterado (variante) puede ser obtenido por intervención humana por alternancia de la secuencia de polinucleótidos que codifica la HSA. La albúmina variante es preferiblemente al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99.5% o al menos 99.8% idéntica a la SEQ ID N.º: 2 y mantiene al menos una de las propiedades principales de HSA. Generalmente, variantes o fragmentos de HSA tendrán al menos 10% (preferiblemente al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%) de actividad de unión de ligandos de HSA (por ejemplo unión de bilirrubina) y al menos 50% (preferiblemente al menos 70%, 80%, 90% o 95%) de actividad oncótica de HSA, peso en peso. La actividad oncótica, conocida también como presión coloidosmótica, de albúmina, variantes de albúmina o fragmentos de albúmina se puede determinar por el método descrito por Hoefs, J.C. (1992) Hepatology 16:396-403. La unión de bilirrubina se puede medir por realce de fluorescencia a 527 nm con respecto a HSA. La bilirrubina (1.0mg) se disuelve en 50microL de 1M de NaOH y se diluye a 1.0mL con agua desmineralizada. La materia prima de bilirrubina se diluye en 100mM Tris-HCl pH8.5, 1mM EDTA para dar 0.6nmol de bilirrubina/mL en una cubeta de fluorómetro. La fluorescencia

se mide por excitación a 448nm y la emisión a 527nm (anchuras de ranura de 10nm) durante la titulación con HSA sobre una gama de proporciones de HSA:bilirrubina de 0 a 5 mol:mol. La variante puede poseer unión alterada a FcRn cuando se compara con la HSA. La secuencia polipeptídica variante es preferiblemente una que no se encuentra en la naturaleza.

5

[0023] El término "secuencias reguladoras" significa todos los componentes (por ejemplo secuencias de ácidos nucleicos) necesarios para la expresión de un polinucleótido insertado en un animal. Cada secuencia reguladora puede ser nativa (es decir del mismo gen) o foránea (es decir a partir de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido transgénico. Tales secuencias reguladoras incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias reguladoras incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional.

10

[0024] El término "enlazado operativamente" significa una configuración donde una secuencia reguladora se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia transgénica de un polinucleótido de manera que la secuencia reguladora dirige la expresión de la secuencia transgénica.

15

[0025] Un número de proteínas terapéuticas fusionado con la albúmina tipo salvaje ha introducido el desarrollo clínico. Algunos ejemplos son interferón-alfa fusionado con la albúmina tipo salvaje, GCSF fusionado con la albúmina tipo salvaje, GLP-1 fusionado con la albúmina tipo salvaje y Factor IX fusionado con la albúmina tipo salvaje. Al probar la vida media de estos compuestos en un modelo animal, la prueba comparará la proteína terapéutica sola contra la proteína terapéutica fusionada con la albúmina, por ejemplo GLP1 y GLP1-albúmina. En tal caso será completamente fácil ver un cambio en la vida media entre las moléculas solamente debido a la diferencia en la filtración renal sin tener en cuenta qué modelo animal se usa.

20

25

[0026] Sin embargo, si se desea investigar la diferencia en una o más (diferentes) propiedades farmacocinéticas de albúmina tipo salvaje y variantes de albúmina donde el cambio en la vida media no será debido a la diferencia de tamaño y filtración renal consecuente, es importante tener un modelo animal que permita la identificación de tales diferencias.

30

[0027] Las albúminas han sido caracterizadas de muchas especies incluido humano, cerdo, ratón, rata, conejo y cabra y comparten un alto grado de secuencia y homología estructural (ver tabla 1). La albúmina de suero humano (HSA) es un polipéptido bien caracterizado de 585 aminoácidos con una masa molecular de 67 kDa. Muchas características de las albúminas se resumen en Peters, T., Jr. (1996) All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical, Applications pp10, Academic Press, Inc., Orlando (ISBN 0-12-552110-3).

35

Tabla 1. Lista no exclusiva de albúminas tipo salvaje de varias especies

Nombre común	Especies	Número de acceso GenBank o SwissProt	% identidad con SEQ ID N.º: 2*	Residuos de secuencia madura
Humano	<i>Homo sapiens</i>	P02768.2	100.0	25-609
Chimpancé	<i>Pan troglodytes</i>	XP 517233 (secuencia predicha)	98.8	25-609
Orangután de Sumatra	<i>Pongo abelii</i>	Q5NVH5.2	98.5	25-609
Macaco (Macaco Rhesus)	<i>Macaca mulatta</i>	NP 001182578	93.3	25-608
Macaco cangrejero (macaco cynomolgous)	<i>Macaca fascicularis</i>	A2V9Z4	93.3	25-608
Gato	<i>Felis catus</i>	P49064.1	81.9	25-608
Perro	<i>Canis lupus familiaris</i>	P49822.3	80.0	25-608
Vaca	<i>Bos taurus</i>	P02769.4	75.8	25-607
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	P08835.2	75.1	25-607
Oveja	<i>Ovis aries</i>	P14639.1	75.0	25-607
Cabra	<i>Capra hircus</i>	B3VHM9	74.8	1-583
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P49065.2 SEQ ID N.º: 8	74.3	25-608
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	P02770.2	73.3	25-608
Ratón	<i>Mus musculus</i>	P07724.3	72.3	25-608
Cobaya	<i>Cavia porcellus</i>	Q6WDN9	72.1	25-608

* la identidad de secuencia fue calculada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch como se implementa en el programa de Needle de EBLOSUM62 (paquete de programas EMBOSS, versión 6,1,0) usando la penalización por apertura de gaps de 10, penalización por extensión de gaps de 0,5 y seleccionando la opción no brief para obtener la identidad más larga.

[0028] Como se puede observar de la tabla 1, la albúmina de cerdo (75,1% de identidad con la albúmina humana) tiene un grado similar de identidad con la albúmina humana como la albúmina de ratón (72,3% identidad con la albúmina humana), albúmina de conejo (74,3% identidad con la albúmina humana) o albúmina de rata (73,3% identidad con la albúmina humana), mientras los primates no humanos: chimpancé (98,9% identidad con la albúmina humana), macaco (93,3% identidad con la albúmina humana) y orangután (98,5% identidad con la albúmina humana), tienen un grado más alto de identidad con la albúmina humana que la albúmina de cerdo.

[0029] La albúmina humana se sintetiza predominantemente en el hígado. Los hepatocitos no contienen un grupo grande de albúmina intracelular almacenada, más bien la proteína es rápidamente segregada desde la célula dando como resultado aproximadamente 13-14g de albúmina que se introduce en el espacio intravascular cada día, equivalente a 3,7%/día de la masa de albúmina total del cuerpo de 360g para una persona de 70kg. La concentración de albúmina de plasma humano normal es 42 ± 3.5 g/L y con un volumen medio de plasma de 2.5-3.0L para una persona de 70kg, la masa de albúmina intravascular media es 113-126g (~120g). La albúmina Intravascular es constantemente cambiada a razón de 4-5%/hr por transporte a través del endotelio con el grupo de albúmina extravascular de 240g, dando como resultado una masa de albúmina total del cuerpo de 360g para una persona de 70kg. La albúmina extravascular retorna al compartimento vascular por drenaje a través del sistema linfático. Del grupo de albúmina extravascular de 240g unos 175g están en intercambio libre con el grupo intravascular (grupo intercambiable total = 295g) mientras otros 65g no están en intercambio libre. Aproximadamente 80% del grupo extravascular total es igualmente dividido entre el músculo y la piel. Una masa de albúmina equivalente a aquella que se introduce en el espacio intravascular (13-14g) es catabolizada del espacio intravascular cada día. El índice de degradación fraccional, 3.7% del grupo intravascular de 120g/día, equivale a una vida media ($t_{1/2}$) de 19 días (Peters, T., Jr. (1996) All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical, Applications pp10, Academic Press, Inc., Orlando (ISBN 0-12-552110-3); C.L. Anderson, et al (2006) Trends in Immuno. 27: 343-348; y J. Kimet al. (2007) Clinical Immuno. 122: 146-155). La albúmina es un componente de muchas secreciones del cuerpo humano incluida leche, sudor, lágrimas y saliva. La albúmina es principalmente perdida desde la circulación por degradación en los órganos mayores, como la piel y el músculo que tiene la circulación más extensa y en consecuencia un grupo grande de células endoteliales que alinean la vasculatura.

[0030] El destino de una molécula de albúmina será la degradación, transporte a través de grupos o compartimentos o intercambio entre ellos, la recuperación y reciclaje se controla en gran parte por la interacción con receptores de albúmina gp18 y gp30, (Ghinea A. et al. (1988) J. Cell Biol. 107: 231-239; Schnitzer J. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 24544-24553; Schnitzer J. Et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 7562-7570), gp60 (Schnitzer J. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 6072-6082; Minshall R. et al. (2002) Histochem. Cell. Biol. 117: 105-112; Malik A. B. (2009) J. Med. Sci. 2,13-17; y Predescu D. y Palade G. E. (1993) Am. J. Physiol. 265; H725-H733) y FcRn (Anderson C. L. et al. (2006) Trends in Immuno. 7, 343-348; Roopenian D. C. and Akilesh, S. (2007), Nat. Rev. Immunol 7, 715-725, Baker K. et. al (2009) Semin Immunopathol. 31, 223-236; Andersen J. T. and Sandlie I. (2009) Drug Metab. Farmacokinet. 24,318-332 y Kuo T. T. et al. (2010) J. Clin. Immunol 30,777-789). gp18 y gp30 están presentes en fibroblastos cultivados, células de músculo liso y células endoteliales; están distribuidos también ubicuamente encontrándose en el corazón, pulmón, músculo, riñón, grasa, cerebro, suprarrenal, páncreas y hígado. La albúmina dañada (por ejemplo mutaciones puntuales, truncamientos, mutantes de glicosilación, oxidación o incluso yodación) tiene una afinidad 1000 veces más alta para ambos gp18 y gp30 que la albúmina nativa. Las albúminas dañadas, una vez internalizadas, son degradadas, un proceso que se puede inhibir por inhibidores conocidos de la degradación lisosómica al igual que inhibieron gp18 y gp30 medió la degradación de albúmina dañada. Por lo tanto gp18 y gp30 parecen proteínas secuestrantes y así pueden mediar la unión de afinidad alta, endocitosis y degradación de albúminas dañadas, pero no albúminas nativas.

[0031] Un análisis de orina de sujetos sanos revela trazos de cantidades (<0.03 g/L) de albúmina, que es significativamente menos del 3-6g de albúmina que pasa a través del glomérulo cada día aunque riñones humanos procesan sangre conteniendo 37kg de albúmina a diario (Peters, T., Jr. (1996) All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical, Applications pp10, Academic Press, Inc., Orlando (ISBN 0-12-552110-3); Gele M. (2005) Ann. Rev. Physiol. 67,573-594). En individuos sanos menos del 1% de la carga de albúmina filtrada glomerular a diario aparece en la orina.

[0032] En seres humanos la larga vida media circulatoria de la albúmina es dependiente de la interacción funcional con FcRn y la naturaleza de la barrera de filtración glomerular que retiene proteínas de más de ~60kDa en el retenido glomerular mientras que las proteínas menores de ~60kDa se filtran y aparecen a una extensión superior progresivamente en el ultrafiltrado glomerular cuando el tamaño de la proteína se reduce.

[0033] Se ha mostrado que la vida media circulatoria de la albúmina afectó hasta varios grados por glicación, glicosilación, oxidación, cambios estructurales y mutaciones puntuales en la secuencia primaria de albúmina, especialmente los daños que afectan la hidrofobicidad y la carga neta de las moléculas reducen la vida media (Nakajou et al. *Biochim Biophys Acta.* (2003) 1623,88-97; (Iwao Y. Et al. (2006) *Biochim Biophys Acta.* 1764,743-749; Iwao Y et al. (2007) *Biochim Biophys Acta.* 1774,1582-1590; Sheffield W. P. et al. (2000) *Thrombosis Research* 99, 613-621).

[0034] Dada la importancia de la interacción con FcRn no es inesperado que las albúminas dañadas o variantes que no interactúan con FcRn hayan reducido la vida media, con la consecuencia de que la concentración de albúmina en el plasma es reducida, una condición conocida como analbuminemia. Las variantes naturales de albúmina (Bartin, Bazzano, Venezia) que tienen truncamientos en el extremo C de albúmina todas han reducido la vida media y en el caso de variantes de Bazzano y Venezia están también asociadas a un aumento en la absorción en el hígado, en el riñón y en el bazo. Investigaciones adicionales han revelado que en el caso de la variante de Martin la vida media reducida se asoció también a una ausencia de cualquier unión de FcRn dependiente del pH (Iwao Y. Et al. (2009) *Biochim Biophys Acta.* 1794,634-641; Andersen J. T. et al. (2010) *Clin Biochem.* 43,367-372). Se debe establecer todavía si muchas de las vidas medias alteradas y absorción en el órgano de albúminas dañadas o variantes *in vivo* observadas son de hecho como el resultado de la unión de FcRn alterada.

[0035] Las vidas medias circulatorias de albúmina de tipo salvaje (Wt) en varios animales ha sido estudiada *in vivo* por un número de diferentes técnicas. La Tabla 2, a continuación, resume algunas de las vidas medias publicadas de albúmina en especies diferentes.

Tabla 2. Vida media de albúmina en especies diferentes

Animal	Vida media de albúmina (días)	Referencia
Ratón	1.2 1	Dixon et al. (1953) <i>Exp. Biol. Med.</i> 83,287-288 Stevens et al. (1992) <i>Fundam. Appl. Toxicol.</i> 19,336-342
Rata	2.0-2.5	Sell S. (1974) <i>Cancer Research</i> 34,1608-1611
Conejo	5.7 ± 0.3 5.5 ± 0.11	Dixon et al. (1953) <i>Exp. Biol. Med.</i> 83,287-288 Hatton et al. (1993) <i>J. Theor. Biol.</i> 161,481-490
Perro	8.2 ± 1.2	Dixon et al. (1953) <i>Exp. Biol. Med.</i> 83,287-288
Cerdo	7.4 a 9.5	Dich & Nielsen (1963) <i>Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.</i> 27,269-273
Oveja	14 a 28	Campbell et al (1961) <i>J. Physiol.</i> 158 113
Humano	19 15.0 ± 1.9 14 a 23 12.7 a 18.2	Peters, T., Jr. (1996) <i>All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical, Applications</i> pp10, Academic Press, Inc., Orlando Dixon et al. (1953) <i>Exp. Biol. Med.</i> 83,287-288 Cohen et al (1961) <i>Clin. Sci.</i> 20 161 Beeken et al (1962) <i>J. Clin. Invest</i> 62 1312
Vaca	20.7 ± 1.1 14 a 19	Dixon et al. (1953) <i>Exp. Biol. Med.</i> 83,287-288 Cornelius et al (1962) <i>Amer. J. Vet. Res.</i> 23 837

[0036] Muchas de las referencias desde 1960 han usado albúmina marcada I-131 para medir la vida media de albúmina, una exposición general cuando se usa albúmina marcada I-131 es grados variables de desnaturalización que incurrieron durante la preparación de la proteína y su marcado radioisotópico (Beeken et al (1962) *J. Clin. Invest* 62 1312). Generalmente se puede observar que la vida media de albúmina aumenta con el tamaño de las especies

[0037] La albúmina se enlaza *in vivo* a su receptor, el receptor de Fc neonatal (FcRn) "Brambell" y esta interacción se conoce por ser importante para la vida media en el plasma de albúmina en que esta salva a la albúmina de la degradación intracelular (Roopenian D. C. y Akilesh, S. (2007), *Nat. Rev. Immunol* 7,715-725.). FcRn es una proteína unida a la membrana, expresada en muchos tipos de célula y de tejido incluidos los endotelios vasculares, renales (podocitos, y túbulo contorneado proximal (PCT)) y cerebrales; células presentadoras de antígenos; intestino, vía respiratoria superior y epitelios alveolares. FcRn es un receptor heterodimérico consistente en una cadena pesada de transmembrana (HC) de 46kDa tipo clase I de MHC que está asociada de manera no covalente a un 12kDa (beta2m). FcRn solo tiene afinidad a la albúmina e IgG a pH ácido (debajo de pH6.5). Los complejos de IgG y albúmina:FcRn, formados en el pH ácido del endosoma, se clasifican en vesículas separadas, así desviando las moléculas hacia afuera desde la ruta de degradación lisosómica predeterminada. Los complejos de albúmina:FcRn son reciclados de nuevo a la superficie de membrana plasmática donde encuentran pH fisiológico y tanto la albúmina como IgG son liberados de FcRn que es luego preparado para rescatar más albúmina e IgG, así aumentando la vida media en el plasma de albúmina e IgG. Por el contrario proteínas internalizadas que no se unen a FcRn se clasifican para la degradación en el lisosoma.

- [0038] El principal sitio de unión de FcRn se localiza dentro de DIII (381-585), (Andersen et al (2010), Clinical Biochemistry 43,367-372). Un modelo de la interacción de albúmina humana con FcRn humano ha sido descrito. Un número de aminoácidos clave en la albúmina han demostrado ser importantes en la unión, sobre todo histidinas H464; H510 y H536 y lisina Lys500 (Andersen et al (2010), Nat. Commun. 3:610. DOI:10.1038/ncomms1607). Los datos indican que los aminoácidos dentro de DI (1-197) de la albúmina contribuyen a la interacción de la albúmina con FcRn. De manera importante, la albúmina interactúa con el hFcRn HC y no el beta2munit (Andersen et al (2010), Clinical Biochemistry 43,367-372; (Andersen et al (2012) Nature Communications Vol. 3, págs. 610). Los datos indican que IgG y albúmina se enlazan de forma no cooperativa a sitios diferentes en FcRn (Andersen et al. (2006), Eur. J. Immunol 36,3044-3051; Chaudhury et al. (2006), Biochemistry 45, 4983-4990; (Anderson C. L. et al. (2006) Trends in Immuno. 7, 343-348; Roopenian D. C. and Akilesh, S. (2007), Nat. Rev. Immunol 7, 715-725; Baker K. et. al (2009) Semin Immunopathol. 31, 223-236; Andersen J. T. and Sandlie I. (2009) Drug Metab. Farmacokinet. 24,318-332 y Kuo T. T. Et al. (2010) J. Clin. Immunol 30,777-789).
- [0039] Estructuras de cristal de FcRn muestran la parte extracelular de la cadena pesada con una plataforma aminoterminal alfa1-alfa 2 de ocho cadenas plisadas en beta antiparalelas recubiertas por dos alfa-hélices largas seguidas del dominio alfa-3 de la membrana proximal (revisado en Roopenian D. C. y Akilesh, S. (2007), Nat. Rev. Immunol 7,715-725.). El beta2munit se une de forma estrecha a los residuos situados debajo de la plataforma alfa1-alfa2 y al dominio alfa3 de la cadena pesada.
- [0040] El hFcRn HC ha sido caracterizada de muchas especies incluido humano, cerdo, ratón, rata, conejo y cabra y comparten un alto grado de homología de secuencias y estructural (ver tabla 3).

Tabla 3. Lista no exclusiva de FcRn HC tipo salvaje de varias especies

Nombre común	Especie	Número de registro	Longitud (aa)	Secuencia madura	% identidad con FcRn HC humano (SEQ ID N.º: 9)*
Humano	<i>Homo sapiens</i>	P55899	365	24-365	100
Chimpancé	<i>Pan troglodytes</i>	XP 512822	370	29-370	97.8
Orangután de Sumatra	<i>Pongo abelii</i>	NP 001125939	365	24-365	97.5
Macaco cangrejero (macaco cynomolgous)	<i>Macaca fascicularis</i>	Q8SPV9	365	24-365	97.0
Macaco (macaco Rhesus)	<i>Macaca mulatta</i>	I0FJX2	365	24-365	96.7
Gorila occidental	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	XP 004061232	392	51-392	84.5
Perro	<i>Canis lupus familiaris</i>	XP 533618	354	23-392	83.1
Gato	<i>Felis catus</i>	XP 003997640	448	116-448	79.7
Vaca	<i>Bos taurus</i>	NP 788830 Q3T119	354	24-354	77.1
Camello	<i>Camelus dromedarius</i>	Q2KN22	355	25-355	76.8
Cabra	<i>Capra hircus</i>	XM 005692722	306	?	75.8
Oveja	<i>Ovis aries</i>	NP 001116875 Q8HZV2	354	24-354	76.3
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	Q866U4	358	23-358	74.6
Cobaya	<i>Cavia porcellus</i>	H0VXB0	354	25-354	77.3
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	NP 001116409 A9Z0W1	358	24-358	72.9
Ratón	<i>Mus musculus</i>	BAA07110	365	22-365	66.9
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	P13599	366	23-366	65.1

* la identidad de secuencia fue calculada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch como se implementa en el programa Needle de EBLOSUM62 (conjunto de programas EMBOSS, versión 6,1,0) usando penalización por apertura de gaps de 10, penalización por extensión de gaps de 0,5 y seleccionando la opción no brief para obtener la identidad más larga.

[0041] Como se puede observar de tabla 3 (identidad de FcRn HC), FcRn HC de cerdo (74.6 % de identidad a FcRn HC humano) tiene un grado similar de identidad con FcRn HC humano como FcRn HC de ratón (66.9% identidad con FcRn HC humano), o FcRn HC de rata (65.1% identidad con FcRn HC humano), mientras los primates no humanos chimpancé (97.8% identidad con FcRn HC humano +), macaco (97% identidad con FcRn HC humano), macaco Rhesus (96.7% identidad con FcRn HC humano), gorila (84.5% identidad con FcRn HC humano) y orangután (97.5% identidad con FcRn HC humano), tienen un grado más alto de identidad con FcRn HC humano que FcRn HC de cerdo.

[0042] La farmacocinética de HSA, incluidas las variantes de HSA y modificaciones en un modelo animal serán influidas por la afinidad de HSA para el FcRn animal nativo en comparación con la afinidad de la albúmina animal nativa para el FcRn de animal nativo. Si la afinidad de la albúmina animal nativa para el FcRn animal es superior a la afinidad de HSA para el mismo FcRn animal, la albúmina animal nativa llevará a una competición superior para el FcRn que sería el caso en un humano.

[0043] Es conocido que FcRn de ratón se enlaza a IgG de ratones y seres humanos mientras que FcRn humano resulta ser más distintivo (Ober et al. (2001) Int. Immunol 13,1551-1559). La unión de albúmina de varias especies a FcRn humano muestra la misma imagen como su unión a IgG. Según el Ejemplo 5 de WO 2011/051489, la jerarquía de unión de albúmina a FcRn humano soluble que varía de unión más fuerte a unión más débil es cobaya => conejo > hámster/perro > rata/ratón > asno > humano > bovino > cabra/oveja > pollo. Estos datos muestran que las albúminas animales tienen afinidades de unión diferentes para shFcRn. Esta selectividad de especies en relación con la interacción FcRn-albúmina es pertinente cuando se considera un modelo animal farmacocinético. La reactividad de especies cruzadas entre albúmina de ratón (MSA) y HSA para FcRn de ratón soluble (smFcRn) y FcRn humano soluble (shFcRn) fue investigada en Andersen et al (2010) Journal of Biological Chemistry vol 285 pp 4826-4836. Un extracto de tabla 2 de este documento se incluye aquí como tabla 4:

Tabla 4: Cinética de las interacciones de albúmina con variantes de FcRn

Especie de albúmina	Especie de FcRn		Ka 10 ³ /Ms	Kd 10 ⁻³ /s	KD μM	KD estado de equilibrio
MSA	Ratón salvaje	tipo	4.2 ± 0.5	39.4±3.1	9.3 ± 0.4	ND
MSA	Humano salvaje	tipo	3.8 ± 0.0	3.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2	ND
HSA	Ratón salvaje	tipo	NA	NA	NA	86. 2±4.1
HSA	Humano salvaje	tipo	2.7 ± 1.3	12.2 ± 5.9	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.5

[0044] Ninguna unión de albúmina de cualquier especie fue observada a pH fisiológico para cualquier receptor. La jerarquía de afinidad de unión a pH 6.0 fue de la siguiente manera; shFcRn:MSA > shFcRn:HSA > smFcRn:MSA > smFcRn:HSA. La cinética de unión de smFcRn:HSA fue tan rápida que la afinidad de unión no pudo ser determinada, lo que significa que en un ratón, HSA se enfrentaría a una competición muy fuerte desde la MSA nativa. A pH ácido, la afinidad de albúmina de suero de ratón para FcRn de ratón es 9.2 veces superior a la afinidad de albúmina de suero humano para FcRn de ratón, mientras la afinidad de albúmina de suero de ratón para FcRn humano es 5,6 veces superior a la afinidad de albúmina de suero humano para FcRn humano. Se mostró que la afinidad de albúmina de suero de ratón para FcRn humano fue 107,5 veces superior a la afinidad de albúmina de suero humano para FcRn de ratón. En cualquier caso, albúmina e IgG podrían unirse al FcRn al mismo tiempo (la unión fue adicional). El efecto de estas afinidades de unión diferenciales de albúmina humana para FcRn de ratón es que en un modelo farmacocinético de ratón, la albúmina humana tipo salvaje, o fusiones, conjugados o asociados de agentes terapéuticos para albúmina humana tipo salvaje son completamente o parcialmente excluidos de la interacción con FcRn de ratón debido a su afinidad reducida para el receptor de FcRn de ratón y/o por competición debido a la abundancia más alta de la albúmina de ratón endógeno. Consecuentemente, el perfil farmacocinético observado y la vida media circulatoria de la albúmina humana tipo salvaje, o fusiones, conjugados o asociados de agentes terapéuticos a la albúmina humana tipo salvaje es comprometido significativamente. De hecho, cuando se usa un ratón para comparar la vida media de un agente terapéutico con el mismo agente terapéutico fusionado o conjugado a HSA como se hizo en Muller et al (2007) Journal of Biological Chemistry vol 282 págs. 12650-12660 será generalmente posible observar un aumento en la vida media de la fusión de HSA. Este aumento puede sin embargo sencillamente deberse a un aumento del peso molecular del agente terapéutico sobre el umbral de depuración renal y no deberse al rescate mediado por FcRn de los agentes terapéuticos fusionados, conjugados o asociados a albúmina.

[0045] FcRn de ratón es promiscuo con relación a especificidad de unión y se enlaza a IgG de muchas especies (es decir humano, primate, ratón, conejo, cobaya, bovino, oveja, y rata). En cambio, FcRn humano es más estricto, y se enlaza solo a IgG de origen humano, de primate, de conejo, y de cobaya (Ober R. J. et al. (2001) Int. Immunol. 13,1551-1559; Stein C. et al. (2011) Mamm. Genome 23:259-269). En consecuencia,

la farmacocinética de IgG humanas o anticuerpos monoclonales se puede evaluar sin competición de IgG de ratón endógeno en el ratón transgénico con FcRn humano (KO homocigótico del gen de ratón y un KI heterocigoto del gen humano) (Roopenian et al (2003) J. Immunol. Vol 170, págs. 3528-3533), mientras en el mismo modelo la farmacocinética de albúmina humana o compuestos fusionados, conjugados o asociados a la albúmina humana será comprometida por competición de albúmina de ratón endógeno de la afinidad superior de albúmina de ratón para FcRn humano y la abundancia superior de la albúmina de ratón en comparación con la fusión, conjugado o asociado la de albúmina humana.

[0046] Como se ilustra en Muller et al (2007) Journal of Biological Chemistry vol 282 págs. 12650, un modelo de ratón puede ser suficiente generalmente para observar un aumento en la vida media de la fusión de HSA debido al aumento del peso molecular del agente terapéutico sobre el umbral de depuración renal. Sin embargo, si un modelo animal debe usarse para comparar la vida media de una HSA variante o una HSA variante modificada con HSA tipo salvaje o una HSA tipo salvaje modificada el rescate mediado por FcRn es importante y luego la competición desde la albúmina nativa jugará un papel importante.

[0047] Un modelo matemático ha sido desarrollado para el reciclaje de FcRn para asistir en el diseño de variantes de albúmina de suero humano con vidas medias circulatorias extendidas (Bergmann K. et al. (2012) 21st PAGE meeting, 5-8 junio, Venecia Italia). Los autores usan el modelo para predecir la vida media circulatoria de variantes de albúmina humana con afinidad aumentada a FcRn humano en un ratón, mono y seres humanos transgénicos con FcRn humano, y concluyen que los aumentos de la vida media observados son menores para el ratón transgénico con FcRn humano que para mono y humano.

[0048] En la presente solicitud, los inventores han constatado que cuando se evalúan las diferencias farmacocinéticas de una HSA variante en comparación con HSA tipo salvaje se necesita que haya la menor competición posible desde la albúmina nativa. Esto se puede conseguir si HSA se enlaza a FcRn nativo de modo similar a la unión de albúmina nativa al mismo FcRn. Este es naturalmente el caso en primates donde las secuencias de aminoácidos de albúmina y FcRn muestran un alto nivel de identidad entre especies (ver tablas 1 y 3). Sin embargo, al moverse a especies no primates la diversidad aumenta y se vuelve más difícil encontrar un modelo animal adecuado para la evaluación de la farmacocinética de una HSA variante en comparación con HSA tipo salvaje.

[0049] La comprensión de la interacción entre HSA y hFcRn es importante para identificar un modelo animal no primate que imita esta interacción lo mejor posible. En el dominio alfa-1 de FcRn HC humano maduro (SEQ ID N.º: 16) el ácido glutámico conservado en la posición 54 es crucial para la unión de HSA y las mutaciones en la posición 56 muestran la disminución en la unión a HSA (Anderson et al 2012 Nature Communication 3:610). En el dominio alfa-2 de FcRn HC humano maduro la histidina conservada en la posición 166 es crucial para la unión de HSA, y si el H en la posición 161 (SEQ ID N.º: 16) se muta a una alanina entonces la unión de HSA se reduce 10 veces (Andersen et al. 2006, Eur. J. Immunol. 36,3044-3051). Un alineamiento de especies cruzadas de regiones seleccionadas de los dominios alfa-1 y alfa-2 se muestra en la figura 7. Basado en este alineamiento los inventores sugieren que la posición 52 y posición 161 de FcRn humano maduro (SEQ ID N.º: 16) son parcialmente responsables de la selectividad de especies anteriormente descrita.

[0050] Un primer aspecto de la presente invención proporciona un método para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una variante de HSA en comparación con HSA tipo salvaje que comprende a) seleccionar un conejo transgénico doble o un roedor transgénico doble donde los transgenes son albúmina humana y un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16; b) administrar la variante de HSA a un animal y HSA tipo salvaje a otro animal como conejo o roedor seleccionado en a); y c) medir una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de la variante de HSA y la HSA tipo salvaje.

[0051] Una especie animal no primate preferida es una donde la afinidad de unión de HSA para el FcRn nativo es aproximadamente la misma ($1 \text{ vez} \pm 0.15$) que la afinidad de unión de la albúmina nativa al FcRn nativo. Tal modelo se parecería mucho a la competición a la que HSA tipo salvaje o HSA variante estaría sometida cuando se inyecta en un humano. En una forma de realización preferida de la presente invención la afinidad de unión de HSA tipo salvaje al FcRn nativo de dicho animal está entre 0.8 y 3.5 veces cuando se compara con la afinidad de unión de la albúmina nativa de dicho animal, más preferido entre 0.9 y 3, más preferido entre 1 y 2.5, más preferido entre 1 y 2, más preferido entre 1 y 1.5, y más preferido la afinidad de unión de HSA tipo salvaje es entre 1 y 1.1 veces superior a la afinidad de unión de la albúmina nativa de dicho animal. Otra especie animal no primate preferida de la presente invención es una donde la afinidad de unión de HSA con el FcRn nativo sería superior a la afinidad de unión de la albúmina nativa de dichas especies animales al FcRn nativo. Tal modelo haría más fácil valorar la diferencia en una o más (diferentes) propiedades farmacocinéticas entre HSA tipo salvaje y la HSA variante y sería muy adecuado para el cribado de un número de HSA variantes para seleccionar uno o más (varios) candidatos principales para conjugación, fusión o asociación con un socio tal como un agente terapéutico. En una forma de realización preferida de la presente invención la afinidad de unión de HSA tipo salvaje al FcRn nativo de dicho animal es al menos 1.5

veces superior a la afinidad de unión de la albúmina nativa de dicho animal, más preferido al menos 2 veces más alta, más preferido al menos 3 veces más alta, más preferido al menos 3.5 veces más alta y más preferido es al menos 4 veces superior a la afinidad de unión de la albúmina nativa de dicho animal. Afinidades de unión entre albúmina y FcRn nativa se miden preferiblemente utilizando una cadena pesada soluble de FcRn de las especies animales seleccionadas acopladas a un chip y medidas por SPR por ejemplo utilizando un instrumento de Biacore. El hFcRn HC soluble es una cadena alfa sin el dominio de transmembrana o un hFcRn HC consistente en tres ectodominios (a1-a3). El FcRn soluble también puede incluir aminoácidos desde el péptido de conexión del FcRn, que está entre el ectodominio y la región de transmembrana del FcRn. Preferiblemente el FcRn HC soluble se coexpresa con beta2-microglobulina desde las mismas especies como se describe en el ejemplo 4. En una forma de realización preferida el FcRn animal soluble comprende una cadena pesada de FcRn y una beta2-globulina desde las mismas especies animales. Más preferiblemente los FcRn solubles están compuestos por FcRn HC soluble de cerdo y β 2-microglobulina de cerdo. Preferiblemente, el método descrito en la sección "Materiales y Métodos" se utiliza para seleccionar una especie animal no primate en el método de la presente invención donde se aplican las variaciones en el ejemplo 4.

[0052] Una especie animal no primate preferida de la presente invención es una especie animal tipo salvaje que expresa su FcRn tipo salvaje y albúmina tipo salvaje. Animales tipo salvaje incluyen especies que han sido criadas por el apareamiento de animales con genotipos de origen natural específico, pero no incluyen animales donde los genes han sido desactivados o insertados por intervención humana. Un animal tipo salvaje no primate preferido es un cerdo, preferiblemente un minicerdo de Göttingen. El cerdo ha sido reconocido como un modelo aceptable para el escalado alométrico de interespecies predictivas (Larsen M. O. and Rolin B. (2004) ILAR Journal 45, 303-313; Zheng Y. et al. (2012) mAbs 4, 243-255; Suenderhauf C. and Parrott N. (2013) Pharm. Res. 30,1-15). Sin embargo, no hay nada en estas descripciones que apunte al cerdo como un sistema modelo preferido para el estudio de la farmacocinética de la albúmina humana o fusiones, conjugados o asociados a la albúmina humana, o albúminas humanas variantes o fusiones, conjugados o asociados a la albúmina humana variante.

[0053] El Ejemplo 2 de la presente invención muestra que la afinidad de la albúmina humana a FcRn soluble de cerdo (spFcRn) es 2.9 veces superior a la afinidad de la albúmina de cerdo a pFcRn soluble. La afinidad de variantes de albúmina humana seleccionadas para pFcRn también ha sido mostrada ser más alta que la afinidad de HSA tipo salvaje para pFcRn. La capacidad para diferenciar entre las propiedades farmacocinéticas de HSA tipo salvaje y HSA variante en los estudios animales en cerdos ha sido mostrada en el ejemplo 5.

[0054] Otras especies animales no primates tipo salvaje preferidas son cabra, oveja, vaca o camello.

[0055] Una característica común entre FcRn de primate y FcRn de cerdo, cabra, oveja, vaca y camello, como se indica por letras en negrita en la figura 7, es que tienen una V en la posición que corresponde con la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 y una H en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con SEQ ID N.º: 16. Todos los demás aminoácidos en las regiones alineadas se conservan completamente a través de todas las especies, salvo la posición 55, 164 y 165. En la posición 164 y 165 humano y macaco tienen R y E respectivamente mientras que todas las otras especies tienen L y G respectivamente. En la posición 55 las especies tienen bien N o S. Ya que el cerdo ha sido mostrado para ser un buen modelo animal como se ilustra en el ejemplo 2, no esperamos que la variación en estas posiciones tenga una influencia significativa en la selectividad de especies en la interacción de FcRn-albúmina. En una forma de realización de la presente invención FcRn nativo tiene una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con SEQ ID N.º: 16.

[0056] En otra forma de realización preferida de la presente invención FcRn nativo tiene una valina en la posición que corresponde con la posición 52 cuando se alinea con SEQ ID N.º: 16.

[0057] En una forma de realización aún más preferida el FcRn nativo tiene una valina en la posición que corresponde con la posición 52 y una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.

[0058] Un animal transgénico preferido para usar en el método de la presente invención es un animal no primate que tiene su FcRn (endógeno) tipo salvaje y albúmina (endógena) tipo salvaje desactivada y una cadena pesada de FcRn humano y albúmina de suero humano insertadas en el genoma. Preferiblemente el FcRn humano es 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100% idéntico a la secuencia madura de SEQ ID N.º: 9 y la HSA humana es 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100% idéntica a la SEQ ID N.º: 2. En tal animal transgénico la cadena pesada de FcRn humano y la HSA tipo salvaje se consideran como el FcRn nativo y la albúmina nativa, y se entiende que no hay (o no sustancialmente) expresión subyacente de la cadena pesada de FcRn endógeno animal de tipo salvaje y albúmina. En una forma de realización preferida de la presente invención el animal transgénico doble es un roedor o conejo. Preferiblemente, el roedor es seleccionado de ratón, cobaya, y rata. Más preferido el roedor es un ratón transgénico doble.

[0059] La especie animal de la presente invención también puede ser un animal donde el FcRn tipo salvaje ha sido mutado de manera que contiene una valina en la posición que corresponde con la posición 52 y/o una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con SEQ ID N.º: 16. En tal animal se mantienen los aminoácidos conservados E54, Q56 y H166 cuando se alinean con SEQ ID N.º: 16. Estas especies animales pueden bien contener albúmina (endógena) tipo salvaje o pueden ser transgénicos con respecto a la albúmina, de manera que la albúmina endógena se desactiva y sustituye con HSA. Un ejemplo de tal animal podría ser un ratón con una variante de FcRn HC de ratón que comprende una valina en la posición 52 y una histidina en la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID NO:16 y donde la variante es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idéntica a la secuencia madura de SEQ ID NO:13 y el ratón también comprende una HSA transgen y preferiblemente la expresión de MSA nativo y la expresión de FcRn tipo salvaje ha sido abolida.

[0060] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un animal transgénico doble. Más específicamente, el genoma del animal transgénico comprende una interrupción homocigótica en su gen de FcRn HC endógeno y gen de albúmina de suero que previene la expresión de una proteína de FcRn HC animal funcional y albúmina de suero animal funcional y el genoma comprende además una secuencia de ADN heterólogo que codifica FcRn HC humano (hFcRn HC) y una secuencia de ADN heterólogo que codifica la albúmina de suero humano (HSA), y donde el animal expresa una proteína de hFcRn HC funcional y HSA funcional. Las secuencias pertinentes para albúmina se indican en la tabla 1 y las secuencias de FcRn HC pertinentes se indican en la tabla 3. Preferiblemente el FcRn humano es 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100% idéntico a la secuencia madura de SEQ ID N.º: 9 o a la SEQ ID N.º: 16, más preferido el FcRn HC humano tiene una histidina en la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16, y los aminoácidos conservados E54, Q56 y H166 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 se mantienen. Preferiblemente la HSA humana es 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100% idéntica a la SEQ ID N.º: 2. Preferiblemente, el animal transgénico doble es un roedor o un conejo. Preferiblemente el roedor es seleccionado de ratón, cobaya, y rata. El animal transgénico doble más preferido es un ratón. Las secuencias de ADN heterólogo que han sido insertadas en el genoma del animal pueden ser operativamente enlazadas a la misma o diferentes secuencias reguladoras como los genes endógenos. La interrupción de los genes endógenos puede hacerse mediante sustitución con el ADN heterólogo correspondiente (genes humanos). Sin embargo, la interrupción puede alternativamente hacerse independientemente de la inserción del ADN heterólogo (genes humanos transgénicos), permitiendo que el ADN heterólogo sea insertado en una posición diferente del genoma que el gen endógeno. La generación de un ratón con FcRn HC humano transgénico como FcRn nativo ha sido descrita en US 7,358,416. Asimismo US 6,949,691 describe cómo producir un ratón con albúmina de suero humano transgénico como la albúmina nativa. Un experto en la técnica de producir animales transgénicos, basado en estos dos documentos, podría ser capaz de producir un animal transgénico que tiene su gen FcRn HC tipo salvaje y gen de albúmina tipo salvaje desactivado y un ADN de FcRn HC humano tipo salvaje y ADN de albúmina de suero humano tipo salvaje insertado en el genoma de manera que FcRn HC humano y HSA se produce en el animal en vez de FcRn de tipo salvaje y albúmina.

[0061] En otra forma de realización de la invención el animal transgénico es un conejo o roedor cuyo genoma comprende una interrupción homocigótica en su gen de cadena pesada de FcRn endógeno y gen de albúmina de suero endógeno y comprende además una secuencia de ADN heterólogo que expresa un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 y una secuencia de ADN heterólogo que codifica suero humano (HSA), donde las secuencias de ADN heterólogo son operativamente enlazadas a la misma o diferentes secuencias reguladoras, y donde dicha interrupción homocigótica previene la expresión de una proteína de FcRn HC funcional de conejo o roedor y albúmina de suero funcional de conejo o de roedor, y donde el animal expresa una proteína de FcRn HC funcional con una histidina en la posición 161 cuando se alinea con SEQ ID N.º: 16 y HSA funcional.

[0062] En otro aspecto de la invención un conejo transgénico o roedor que expresa un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 y albúmina humana y que ha sido desactivado para las proteínas nativas correspondientes se utiliza para comparar una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una molécula de control y una molécula de prueba donde la molécula de control comprende HSA tipo salvaje y la molécula de prueba comprende una variante de HSA. En otra forma de realización el FcRn comprende además una valina en la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16. En una forma de realización preferida el transgen FcRn es seleccionado de humano, chimpancé, macaco, vaca, cabra, oveja, camello y cerdo. Alternativamente, el FcRn es una variante del FcRn tipo salvaje con una H en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 y/o una V en la posición que corresponde con la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16, y donde la variante es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idéntica al FcRn tipo salvaje del animal. En tal variante, se mantienen los aminoácidos conservados E54, Q56 y H166 cuando se alinean con SEQ ID N.º: 16. Otros aminoácidos más preferidos que son conservados entre humano, chimpancé, macaco, vaca, cabra, oveja, camello, cerdo, perro, cobaya, conejo, rata y ratón son mantenidos.

- [0063] Como se ha descrito anteriormente, el método de la presente invención puede utilizarse para filtrar moléculas de HSA variantes para identificar el efecto *in vivo* de la afinidad de unión de FcRn alterado cuando se compara con HSA tipo salvaje. Preferiblemente, las variantes evaluadas en el método de la presente invención han aumentado la unión de FcRn humano en comparación con HSA tipo salvaje. En una forma de realización preferida la KD de la albúmina variante es al menos 2X inferior a la KD de HSA tipo salvaje, más preferiblemente la KD de la albúmina variante es al menos 5X, 10X, 15X o 20X, 30X, 50X, 75X inferior al KD de HSA tipo salvaje, de la forma más preferible la KD de la albúmina variante es al menos 100X inferior al KD de HSA tipo salvaje (la variante tiene cien veces la afinidad de unión a FcRn humano que HSA tipo salvaje). En otra forma de realización la albúmina variante tiene una unión más débil a FcRn humano que HSA tipo salvaje. En una forma de realización preferida la KD de la albúmina variante es al menos 2X superior a la KD de HSA tipo salvaje (la variante tiene la mitad de la afinidad de unión a FcRn humano que HSA tipo salvaje), más preferiblemente la KD de la albúmina variante es al menos 5X, 10X, 15X o 20X, 30X, 50X, 75X superior a la KD de HSA tipo salvaje, de la forma más preferible la KD de la albúmina variante es al menos 100X superior a la KD de HSA tipo salvaje (la variante tiene un centésimo de la afinidad de unión con FcRn humano que HSA). El método de la presente invención puede en particular usarse para seleccionar una HSA variante para usar en una prueba preclínica, donde la HSA variante ha mejorado una o más (varias) propiedades farmacocinéticas cuando se compara con HSA tipo salvaje. En una forma de realización preferida la HSA variante tiene una vida media más larga que HSA tipo salvaje.
- [0064] La presente invención también se refiere a moléculas de HSA variante como tal, que han sido seleccionadas utilizando el método de la presente invención. En particular una HSA variante con una o más (varias) propiedades farmacocinéticas mejoradas cuando se compara con HSA tipo salvaje que se selecciona para usar en una prueba preclínica está comprendida por la presente invención. Propiedades farmacocinéticas mejoradas son propiedades que se cambian en comparación con HSA tipo salvaje y que dará lugar a una ventaja en relación con por ejemplo régimen de administración, dosis, objetivo, o eficacia de tratamiento en comparación con HSA tipo salvaje. Se prefiere una HSA variante que tiene una vida media más larga que HSA tipo salvaje.
- [0065] El método de la presente invención también puede usarse para ensayar el efecto de modificaciones a HSA o HSA variante. Por ejemplo, el método se puede utilizar para valorar el efecto de a) varios enlaces entre un socio, tal como un agente terapéutico, y HSA (tanto enlaces de fusión como enlaces de conjugación) o b) la posición en HSA con la que se hace la conjugación o fusión o c) la química usada para conjugación del socio. Esta lista no es exhaustiva y la persona experta sabrá usar el método de la presente invención para valorar otros efectos de modificación. Generalmente, modificaciones a HSA pueden afectar la unión de FcRn como se ha visto con algunos de los daños naturales como glicosilación y oxidación anteriormente descritas. El presente modelo es por lo tanto pertinente para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de modificaciones a HSA tipo salvaje y HSA variante, ya que estas modificaciones pueden afectar a la unión de FcRn de la HSA tipo salvaje o variante. En una forma de realización preferida la HSA tipo salvaje y HSA variante son modificadas añadiendo una funcionalidad adicional. La funcionalidad adicional puede coger la forma de una molécula compañera por ejemplo un agente terapéutico, agente de diagnóstico, molécula objetivo que puede asegurar la entrega de la HSA a células específicas en un humano, una etiqueta de purificación o etiqueta de identificación como His, FLAG, GST, o marcadores de fluorescencia. En una forma de realización preferida la HSA variante y tipo salvaje modificadas por fusión, conjugación o asociación con un socio. Preferiblemente el socio es un agente terapéutico, incluidas las vacunas. Para comparar la diferencia entre la HSA variante modificada y HSA tipo salvaje modificada la modificación debería ser idéntica para ambas moléculas, por ejemplo en forma de una fusión, conjugación o asociación al mismo socio. En una forma de realización preferida de la presente invención el modelo animal se utiliza para valorar el efecto en una o más (varias) de las propiedades farmacocinéticas de un socio seleccionado, por ejemplo agente terapéutico, y el método de unir el socio a la molécula de control y de prueba es evaluado. La molécula de control puede por ejemplo ser HSA tipo salvaje unida al socio y la molécula de prueba es una HSA variante unida al mismo socio en la misma posición. El método de la unión de la albúmina y el socio seleccionado puede por ejemplo ser uno o más (varios) de a) a c) mencionados anteriormente. En una forma de realización el socio se conjuga en posiciones diferentes en la albúmina. Las posiciones son idénticas para tanto la molécula de control como de prueba, así si por ejemplo la posición 1 y 34 en HSA tipo salvaje (SEQ ID NO:2) se evalúa para conjugación, la misma posición se evalúa en la HSA variante usando del mismo socio, así se evalúa el efecto de las posiciones diferentes en la unión de FcRn. En otra forma de realización el socio se conjuga con tecnologías de conjugación diferentes al control de albúmina y moléculas de prueba. La tecnología o química de conjugación usada es idéntica para tanto la molécula de prueba como de control, así si por ejemplo uno o más grupos de maleimida se evalúan para conjugación, los mismos grupos se evalúan en la HSA variante usando el mismo socio, así evaluando el efecto de las diferentes técnicas de conjugación en la unión de FcRn. En otra forma de realización el socio se fusiona con o sin enlaces diferentes en el extremo C y/o extremo N de la albúmina. Los enlaces son idénticos para tanto las moléculas de control como de prueba. El péptido de enlace entre las partes fusionadas (albúmina y socio) proporciona separación física superior entre las fracciones y así maximiza la accesibilidad del socio de fusión, por ejemplo el agente terapéutico, por ejemplo, para la unión a su receptor cognado. El péptido de enlace puede consistir en aminoácidos de manera que son flexibles o más rígidos.

[0066] En una forma de realización preferida el socio, por ejemplo agente terapéutico, se fusiona al extremo N de la albúmina. En una forma de realización alternativa el socio, por ejemplo agente terapéutico, se fusiona al extremo C de la albúmina.

5

[0067] Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de fusión de albúmina de la invención pueden tener la fórmula siguiente R2-R1 R1-R2 R2-R1-R2 R2-L-R1-L-R2 R1-L-R2 R2-L-R1 o R1-L-R2-L-R1, donde R1 es al menos una secuencia compañera de fusión (con fragmentos o variantes de la misma), y no necesariamente los mismos polipéptidos, L es un enlazador y R2 es una secuencia de albúmina (que incluye fragmentos o variantes de la misma). Ejemplos de enlaces incluyen (GGGGS)_N o (GGGS)_N o (GGS)_N, donde N es un número entero mayor que o igual a 1 y donde G representa glicina y S representa serina. Los enlaces pueden tener una longitud variable de 1 a 50 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 40 aminoácidos, más preferiblemente de 5 a 35 aminoácidos, aún más preferiblemente de 7 a 30 aminoácidos y de la forma más preferible de 10 a 25 aminoácidos. Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre el socio y la albúmina, por ejemplo en forma de un enlazador escindible. El sitio se puede dividir tras la secreción del polipéptido de fusión, liberando los dos polipéptidos. El enlazador puede ser alternativamente escindible, por ejemplo por una proteasa que existe en el paciente, de manera que la fracción compañera de fusión es liberada de la albúmina en el paciente, potencialmente en relación con un evento de activación. Un ejemplo de un evento de activación conducido por proteasa es la cascada de coagulación (WO 91/09125, WO 2007/090584 y WO 2007/144173). Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

10

15

20

25

[0068] La albúmina se usa en preparaciones de compuestos beneficiosos farmacéuticamente por ejemplo como fusiones, conjugaciones o asociaciones con un agente terapéutico. La presente invención también incluye HSA variante modificada tal como una HSA variante que es fusionada, conjugada o asociada a un agente terapéutico, donde la fusión, conjugación o asociación se selecciona por un método de la presente invención. En particular una HSA variante fusionada, conjugada o asociada a un socio, por ejemplo agente terapéutico, con una o más (varias) propiedades farmacocinéticas mejoradas cuando se compara con HSA tipo salvaje fusionada, conjugada o asociada al mismo socio, donde la HSA variante modificada se selecciona para usar en una prueba preclínica está comprendida por la presente invención. Más preferida es una HSA variante fusionada, conjugada o asociada a un socio, por ejemplo agente terapéutico, que tiene una vida media más larga que HSA tipo salvaje fusionada, conjugada o asociada al mismo socio, por ejemplo un agente terapéutico.

30

35

40

[0069] HSA variante y la HSA variante modificada de la presente invención se puede formular en una composición farmacéutica que comprende la HSA variante y un excipiente. Una manera de formular HSA variante o HSA variante modificada puede ser como nanopartículas o micropartículas. La incorporación de un socio, por ejemplo agente terapéutico, en una partícula de albúmina ha sido por ejemplo descrita en WO 00/71079. Técnicas para incorporación de una molécula en nano- o micropartículas se conocen en la técnica. Métodos preferidos para la preparación de nano- o micropartículas que se pueden aplicar a la variante de albúmina, fragmento, fusión, conjugado o asociado del mismo según la invención se describe en WO 2004/071536 o WO2008/007146 u Oner & Groves (Pharmaceutical Research, Vol 10(9), 1993, páginas 1387 a 1388).

45

50

[0070] Para todos los aspectos de la invención polipéptidos socios de fusión y/o conjugados y/o asociados pueden comprender uno o más (varios) de: ligando BB 4-1, 5-hélices, una quimiocina C-C humana, una quimiocina L105 humana, una quimiocina L105 humana designada huL105_3, una monocina inducida por gamma-interferón (MIG), una proteína CXCR4B parcial, una proteína básica plaquetaria (PBP), α 1-antitripsina, homólogo de ACRP-30; componente del complemento C1q C, quimiocina expresada por adenoides (ADEC), aFGF; FGF-1, AGF, proteína AGF, albúmina, un etopósido, angiostatina, vacuna contra el ántrax, anticuerpos específicos para colapsina, antistasina, anticuerpos de la familia beta Anti-TGF, antitrombina III, APM-1; ACRP-30; Famoxina, especies de apo-lipoproteína, Arilsulfatasa B, proteína b57, BCMA, proteína Beta-tromboglobulina (beta-TG), bFGF; FGF2, factores de coagulación sanguínea, enzima furina de procesamiento de BMP, BMP-10; BMP-12; BMP-15; BMP-17; BMP-18; BMP-2B, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-9, Proteína-2 morfogénica de hueso, calcitonina, Calpaína-10a, Calpaína-10b, Calpaína-10c, vacuna contra el cáncer, carboxipeptidasa, quimiocina C-C, MCP2, variante CCR5, CCR7; CD11a Mab, CD137, proteína del receptor BB 4-1, CD20 Mab, CD27; CD27L, CD30; ligando CD30, inmunotoxina CD33, CD40; CD40L, CD52 Mab, proteína Cerebus, eotaxinas quimiocinas, quimiocina hIL-8, quimiocina hMCP1, quimiocina hMCP1a, quimiocina hMCP1b, quimiocina hMCP2, quimiocina hMCP3, quimiocina hSDF1b, quimiocina MCP-4, quimiocina TECK y variante TECK, proteína IL-8M1 tipo quimiocina en toda su longitud y madurez, proteína IL-8M10 tipo quimiocina en toda su longitud y madurez, proteína IL-8M3 tipo quimiocina en

55

60

65

toda su longitud y madurez, proteína IL-8M8 tipo quimiocina en toda su longitud y madurez, proteína IL-8M9 tipo quimiocina en toda su longitud y madurez, proteína PF4-414 tipo quimiocina en toda su longitud y madurez, proteína PF4-426 tipo quimiocina en toda su longitud y madurez, proteína PF4-M2 tipo quimiocina en toda su longitud y madurez, vacuna contra el cólera, proteína tipo condromodulina, ligando c-kit; SCF; factor de crecimiento de mastocito; MGF; factor de célula madre derivado de fibrosarcoma, CNTF y fragmento del mismo (tal como CNTFAx15(Axokine™)), factores de coagulación en ambas formas pre y activas, colágenos, complemento C5 Mab, tejido conjuntivo que activa la proteína III, CTAA16,88 Mab, CTAP-III CTLA4-Ig, CTLA-8, CXCR3; receptor 3 de quimiocina CXC, cianovirina-N, Darbeopetina, designado exodus, designado huL105 7; DIL-40, ADNsa, EDAR, receptor de EGF Mab, ENA-78, Endostatina, eotaxina, neutrofilo epitelial que activa la proteína-78, receptor EPO; EPOR, eritropoyetina (EPO) y simuladores EPO, Eutropina, proteína Exodus, Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X y factor XIII, proteína inhibitoria de ligando FAS (DcR3), FasL, FGF, FGF-12; homólogos de factor de crecimiento de fibroblasto factor-1, FGF-15, FGF-16, FGF-18, FGF-3 INT-2, FGF-4; gelonina, HST-1 HBGF-4, FGF-5, FGF-6; factor-2 transformante segregado ligante de heparina, FGF-8, FGF-9; factor de activación de Glia, fibrinógeno, flt-1, ligando flt-3, subunidad alfa de hormona estimulante del folículo, subunidad Beta de hormona estimulante del folículo, follitropina, Fractalquina, proteína Troponina I de fragmento. miofibrilar, FSH, galactosidasa, Galectina-4, G-CSF, GDF-1, terapia genética, factor de crecimiento derivado de glioma, glucagón, péptidos de tipo glucagón, glucocerebrosidasa, glucosa-oxidasa, glucosidasa, Glicodelina-A; proteína endométrica asociada a la progesterona, GM-CSF, gonadotropina, proteína-2 quimiotáctica de granulocito (GCP-2), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos, hormona del crecimiento, oncogen alfa relacionado con el crecimiento (GRO-alfa), oncogen beta relacionado con el crecimiento (GRO-beta), oncogen gamma relacionado con el crecimiento (GRO-gamma), hAPO-4; TROY, hCG, antígeno de superficie de Hepatitis B, vacuna contra Hepatitis B, receptor Mab de HER2, hirudina, gp120 de VIH, gp41 de VIH, péptido inhibidor de VIH, péptidos inhibidores de proteasa de VIH, inhibidores de proteasa de HIV-1, vacuna contra HPV, proteína 6CKine humana, proteína Act-2 humana, factor inhibitorio de adipogénesis humana, receptor de factor-2 estimulante de células B humanas, quimiocina beta humana H1305 (MCP-2), quimiocina C-C DGWCC humana, proteína ELC de quimiocina C-C humana, interleucina C de quimiocina tipo CC humana, proteína CCC3 humana, quimiocina CCF18 humana, proteína quimiocina tipo CC humana designada SLC (quimiocina linfoide secundaria), formas cortas beta-8 de quimiocina humana, quimiocina humana C10, quimiocina humana CC-2, quimiocina humana CC-3, quimiocina humana CCR-2, quimiocina humana Ckbeta-7, quimiocina humana ENA-78, quimiocina eotaxina humana, quimiocina gROalpha humana, quimiocina gRObeta humana, quimiocina HCC-1 humana, quimiocina I-309 humana, quimiocina IP-10 humana, quimiocina L105_3 humana, quimiocina L105_7 humana, quimiocina MIG humana, proteína quimiocina MIG-beta humana, quimiocina MIP-1alfa humana, quimiocina MIP1beta humana, quimiocina MIP1beta humana, quimiocina MIP-3alfa humana, quimiocina MIP-3beta humana, quimiocina PF4 humana, proteína quimiocina 331D5 humana, proteína quimiocina 61164 humana, receptor de quimiocina humana CXCR3, quimiocina SDF1alfa humana, quimiocina SDF1beta humana, quimiocina ZSIG-35 humana, proteína Chr19Kine humana, CKbeta-9 humana, quimiocina de aminoácido CX3C 111 humana, interleucina-40 DNAX humana, quimiocina C-C DVic-1 humana, secuencia de proteína EDIRF I humana, secuencia de proteína EDIRF II humana, quimiocina eotaxina tipo CC de eosinocitos humana, quimiocina expresada en eosinofilocito humana (EEC), troponina C de músculo esquelético de contracción rápida humana, troponina I de músculo esquelético de contracción rápida humana, subunidad C de troponina de músculo esquelético de contracción rápida humana, proteína de subunidad I de troponina de músculo esquelético de contracción rápida humana, subunidad T de troponina de músculo esquelético de contracción rápida humana, troponina T de músculo esquelético de contracción rápida humana, quimiocina expresada en el bazo fetal humano, FSEC, receptor GM-CSF humano, quimiocina gro-alfa humana, quimiocina gro-beta humana, quimiocina gro-gamma humana, proteína IL-16 humana, secuencia de proteína IL-1RD10 humana, IL-1RD9 humana, cadena alfa del receptor IL-5 humano, receptor IL-6 humano, proteína hIL8RA del receptor IL-8 humano, proteína hIL8RB del receptor IL-8 humano, proteína del receptor IL-9 humano, variante #3 de proteína del receptor IL-9 humano, fragmento de variante de proteína del receptor IL-9 humano, fragmento#3 variante de proteína del receptor IL-9 humano, interleucina 1 delta humana, interleucina 10 humana, interleucina 18 humana, derivados de interleucina 18 humana, precursor de interleucina-1 beta humana, precursor de interleucina-1 beta humana, proteína accesoria de receptor de interleucina-1 humana, receptor antagonista beta de interleucina-1 humana, receptor tipo-3 de interleucina-1 humana, (precursor) Interleucina-10 humana, receptor de interleucina-11 humana, subunidad de 40 kD de interleucina-12 humana, receptor beta-1 de interleucina-12 humana, receptor beta-2 de interleucina-12 humana, proteína p35 de Interleucina-12 humano, proteína p40 Interleucina-12 humana, receptor de interleucina-12 humana, receptor alfa de interleucina-13 humana, receptor beta de interleucina-13 humana, interleucina-15 humana, receptor de clon P1 de interleucina-15 humana, receptor de interleucina-17 humana, proteína interleucina-18 (IL-18) humana, interleucina-3 humana, receptor de interleucina-3 humana, variante de interleucina-3 humana, receptor de interleucina-4 humana, interleucina-5 humana, interleucina-6 humana, interleucina-7 humana, interleucina-8 (IL-8) humana, antagonista de receptor IL-1 intracelular humano, proteína de fusión de región hipervariable IP-10 y gp120 de HIV-1 humana, proteína de fusión de epítipo de núcleo (VNT) Muc-1 humano e IP-10 humano, quimiocina hepática y regulada por activación (LARC) humana, proteína en toda su longitud y madura LKn-1 humana, proteína en toda su longitud y madura de quimiocina asociada mamaria humana (MACK), quimiocina madura humana Ckbeta-7, gro-alfa maduro humano, polipéptido gro-gamma maduro humano usado para tratar

sepsis, proteína de fusión de epítipo de núcleo de MCP-3 humano y Muc-1 (VNT) humano, proteína MI10 humana, proteína MI1A humana, factor quimioatrayente de monocito humano hMCP-1, factor quimioatrayente de monocito humano hMCP-3, secuencia de proproteína quimiotáctica de monocito humano (MCP-3), dominio tipo quimiocina neurotactina humana, CXC quimiocina H174 no ELR humana, CXC quimiocina IP10 no ELR humana, CXC quimiocina Mig no ELR humana, mutantes PAI-1 humanos, proteína humana con actividad IL-16, proteína humana con actividad IL-16, quimiocina linfoide secundaria humana, proteína SISD (SLC) humana, STCP-1 humana, quimiocina derivada de célula estromal humana, SDF-1, quimiocina expresada por reacción de linfocitos mezclados con células T (TMEC) humanas, citocina regulada por activación (TARC) y del timo humano, timo humano expresado, TNF-alfa humano, TNF-alfa humano, TNF-beta humano (LT-alfa), secuencia de proteína quimiocina eotaxina 3 tipo CC humana, receptor interleucina-1 tipo II humano, proteína interleucina-4 (hIL-4) tipo salvaje humana, proteína ZCHEMO-8 humana, anticuerpos Anti-VEGF humanizados, y fragmentos de los mismos, anticuerpos Anti-VEGF humanizados, y fragmentos de los mismos, hialuronidasa, subunidad ICE 10 kD, subunidad ICE 20 kD, subunidad ICE 22 kD, Iduronato-2-sulfatasa, Iduronidasa, IL-1 alfa, IL-1 beta, inhibidor IL-1 (IL-1i), IL-1 maduro, receptor de IL-10, IL-11, subunidad p40 de IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, receptor de IL-15, IL-17, receptor IL-17, IL-19, fragmentos de IL-1i, antagonista del receptor IL1, IL-21 (TIF), proteína de fusión que contiene IL-3, proteínas mutantes de IL-3, variantes de IL-3, IL-4, muteína de IL-4, muteína Y124G de IL-4, muteína Y124X de IL-4, muteínas de IL-4, receptor IL-5, IL-6, receptor de IL-6, clon receptor de IL-7, receptor de IL-8, variante de proteína madura de IL-9 (versión Met117), inmunoglobulinas o moléculas basadas en inmunoglobulina o fragmento de estas (por ejemplo un Small Modular ImmunoPharmaceutical™ ("SMIP") o dAb, fragmentos Fab', F(ab')₂, scAb, scFv o fragmento de scFv), incluyendo pero no limitado a plasminógeno, vacuna contra la gripe, inhibina alfa, inhibina beta, insulina, factor de crecimiento de tipo insulina, integrina Mab, inhibidor de tripsina interalfa, proteína inducible por interferón gama (IP-10), interferones (tales como especies y sub-especies de interferón alfa, especies y sub-especies de interferón beta, especies y sub-especies de interferón gamma), interleucina 6, receptor de interleucina 8 (IL-8), receptor B de interleucina 8, interleucina-1 alfa, proteína p43 asociada al receptor de Interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4 muteínas, proteína Interleucina-8 (IL-8), interleucina-9, proteína madura (versión Thr117) interleucina-9 (IL-9), interleucinaas (tales como IL10, IL11 e IL2), vacuna contra encefalitis japonesa, inhibidor de calicreína, factor de crecimiento de queratinocito, proteína de dominio de Kunitz (tal como aprotinina, proteína amiloide precursora y aquellas descritas en WO 03/066824, con o sin fusiones de albúmina), proteína de dominio de Kunitz (tal como aprotinina, proteína amiloide precursora y aquellas descritas en WO 03/066824, con o sin fusiones de albúmina), LACI, lactoferrina, proteína II de unión a TGF-beta latente, leptina, quimiocina-1 expresada en el hígado (LVEC-1), quimiocina-2 expresada en el hígado (LVEC-2), LT-alfa, LT-beta, hormona leuteinizante, vacuna contra Lyme, Linfotactina, análogo MDC de quimiocina derivada de macrófagos (n+1), análogo de quimiocina derivada de macrófagos, análogo MDC-eyfy de quimiocina derivada de macrófagos, análogo MDC-yl de quimiocina derivada de macrófagos, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), Maspina; inhibidor 5 de proteasa, receptor MCP-1, MCP-1a, MCP-1b, MCP-3, receptor MCP-4, M-CSF, proteína inhibidora de melanoma, proteínas unidas a la membrana, interleucina 9 de Met117 humana, MIP-3 alfa, MIP-3 beta, MIP-Gamma, MIRAP, Rantes modificado, anticuerpo monoclonal, MP52, interleucina mutante 6 S176R, troponina I de proteína contráctil miofibrilar, péptido natriurético, factor beta de crecimiento nervioso, Factor-beta2 de crecimiento nervioso, Neuropilina-1, Neuropilina-2, Neurotactina, Neurotrofina-3, Neurotrofina-4, Neurotrofina-4a, Neurotrofina-4b, Neurotrofina-4c, Neurotrofina-4d, péptido-2 de activación neutrofílica (NAP-2), Receptor NOGO-66, NOGO-A NOGO-B NOGO-C, quimiocina beta nueva designada PTEC, quimiocina modificada N-terminal GroHEK/hSDF-1alfa, quimiocina modificada N-terminal GroHEK/hSDF-1beta, quimiocina modificada N-terminal met-hSDF-1 alfa, quimiocina modificada N-terminal met-hSDF-1 beta, OPGL, Proteína -1 osteogénica, OP-1; BMP-7, Proteína-2 osteogénica, OX40; ACT-4, OX40L, oxitocina (Neurofina I), hormona paratiroidea, parcheado, parcheado-2, PDGF-D, toxoide de tos ferina, quimiocina expresada por glándula pituitaria (PGEC), factor de crecimiento de placenta, Factor-2 de crecimiento de placenta, Inhibitor-1 activador del plasminógeno; PAI-1, Inhibitor-2 activador del plasminógeno; PAI-2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas Bv-sis, precursor de factor de crecimiento derivado de plaqueta un, precursor de factor de crecimiento derivado de plaqueta B, plaqueta Mab, factor de crecimiento de la célula endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas, cadena de factor A, cadena de factor B de crecimiento derivado de las plaquetas, polipéptido usado para tratar sepsis, variante "milano" de Preproapolipoproteína, variante "paris" de Preproapolipoproteína, pre-trombina, quimiocina CC "ILINCK" de Primate, quimiocina CXC "IBICK" de Primate, proinsulina, prolactina, Prolactina2, prosáptido, péptidos inhibidores de proteasa, proteína C, proteína S, pro-trombina, prourocinasa, RANTES, RANTES 8-68, RANTES 9-68, péptido RANTES, receptor RANTES, interleucina-16 recombinante, resistina, restrictocina, inhibidores de proteasa retrovírica, ricina, vacuna contra rotavirus, Mab de RSV, saporina, sarcina, polipéptidos segregados y de transmembrana, polipéptidos segregados y de transmembrana, colinesterasa de suero, proteína sérica (tal como un factor de coagulación sanguínea), Proteína cinasa 3 del receptor de BMP soluble, Receptor de VEGF Soluble, Factor inhibitorio de células madre, vacuna contra *Staphylococcus*, Factor alfa 1 derivado del estroma, Factor beta 1 derivado del estroma, sustancia P (taquiquinina), péptido T1249, péptido T20, endonucleasa T4, TACI, Tarc, TGF-beta 1, TGF-beta 2, interleucina humana 9 Thr117, trombina, tromboxetina, derivado 1 de tromboxetina, derivado 2 de tromboxetina, derivado 3 de tromboxetina, derivado 4 de tromboxetina, derivado 5 de tromboxetina,

derivado 6 de trombopoyetina, derivado 7 de trombopoyetina, quimiocina expresada por el timo (TECK), hormona estimulante de la tiroides, péptido de anticoagulante de garrapata, proteína Tim-1, precursor de TNF-alfa, TNF-R, TNF-RII; Receptor p75 de TNF; Receptor de muerte, tPA, transferrina, factor beta de crecimiento transformante, péptidos de troponina, proteína quimiotáctica 2 de monocito truncado (6-76),
 5 proteína RANTES truncada (3-68), factor de necrosis tumoral, urato-oxidasa, uroquinasa, vasopresina (Neurofisina II), VEGF R-3 flt-4, Receptor VEGF; KDR; flk-1, VEGF-110, VEGF-121, VEGF-138, VEGF-145, VEGF-162, VEGF-165, VEGF-182, VEGF-189, VEGF-206, VEGF-D, VEGF-E; VEGF-X, factor de von Willebrand, proteína quimiotáctica 2 de monocito tipo salvaje, proteína quimiotáctica 2 de monocito tipo salvaje, ZTGF-beta 9, andamios de anticuerpo alternativos por ejemplo anticalina(s), adnectina(s),
 10 fragmento(s) de fibrinógeno, nanocuerpos tales como nanocuerpos de camélido, infestina, y/o cualquiera de las moléculas mencionadas en WO01/79271 (particularmente página 9 y/o tabla 1), WO 2003/59934 (particularmente tabla 1), WO03/060071 (particularmente tabla 1) o WO01/079480 (particularmente tabla 1).

[0071] Además, conjugados pueden comprender uno o más (varios) de fármacos para quimioterapia tales como: ácido 13-cis-retinoico, 2-CdA, 2-Clorodeoxiadenosina, 5-Azacidina, 5-Fluorouracilo, 5-FU, 6-Mercaptopurina, 6-MP, 6-TG, 6-Tioguanina, Abraxane, Accutane®, Actinomicina D, Adriamycin®, Aducril®, Agrylin®, Ala-Cort®, Aldesleucina, Alemtuzumab, ALIMTA, Alitretinoína, Alkaban-AQ®, Alkeran®, Ácido holotransretinoico, Interferón alfa, Altretamina, Ametopterina, Amifostina, aminoglutetimida, Anagrelida, Anandron®, Anastrozol, Arabinosilicitosina, Ara-C, Aranesp®, Aredia®, Arimidex®, Aromasin®, Arranon®,
 20 Trióxido arsénico, Asparaginasa, ATRA, Avastin®, Azacidina, BCG, BCNU, Bevacizumab, Bexaroteno, BEXXAR®, Bicalutamida, BiCNU, Blenoxane®, Bleomicina, Bortezomib, Busulfano, Busulfex®, C225, Leucovorina de calcio, Campath®, Camptosar®, Camptotecina-11, Capecitabina, Carac™, Carboplatina, Carmustina, oblea de carmustina, Casodex®, CC-5013, CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidine®, Cetuximab, Clorambucilo, Cisplatina, Factor Citrovórum, Cladribina, Cortisona, Cosmegen®, CPT-11, Ciclofosfamida, Cytadren®, Citarabina, Citarabina, Cytosar-U® liposómico, Cytoxan®, dacarbazina, Dacogen, Dactinomicina, Darbepoetina Alfa, Dasatinib, Daunomicina, Daunorubicina, hidroclicloruro de daunorubicina, Daunorubicina, DaunoXome® liposómico, Decadron, Decitabina, Delta-Cortef®, Deltasone®, Denileucina difitox, DepoCyt™, Dexametasona, Acetato de dexametasona, Fosfato sódico de dexametasona, Dexasona, Dextrazoxana, DHAD DIC, Diodex, Docetaxel, Doxil®, Doxorubicina, Doxorubicina liposómica, Droxia™, DTIC, DTIC-Dome®, Duralone®, Efudex®, Eligard™, Ellence™, Eloxatin™, Elspar®, Emcyt®, Epirubicina, Epoetina alfa, Erbitux™, Erlotinib, Erwinia L-asparaginasa, Estramustina, Etiol, Etopophos®, Etoposida, Fosfato de Etoposidae, Eulexin®, Evista®, Exemestano, Fareston®, Faslodex®, Femara®, Filgrastim, Floxuridina, Fludara®, Fludarabina, Fluoroplex®, Fluorouracil, Fluorouracil (crema), Fluoximesterona, Flutamida, Ácido fólico, FUDR®, Fulvestrant, G-CSF, Gefitinib, Gemcitabina, Gemtuzumab ozogamicina, Gemzar®, Gleevec™, oblea de Gliadel®, GM-CSF, Goserelina, factor estimulador de colonias de granulocitos, Factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos, Halotestin®, Herceptin®, Hexadrol, Hexalen®, Hexametilmelamina, HMM Hycamtin®, Hydrea®, Hydrocort Acetate®, Hidrocortisona, Fosfato sódico de hidrocortisona, Succinato sódico de hidrocortisona, Fosfato de hidrocortisona, Hidroxiurea, Ibritumomab, Ibritumomab Tiuxetan, Idamycin®, Idarrubicina, Ifex®, IFN-alfa, ifosfamida, IL-11, IL-2, Imatinib mesilato, Imidazol carboxamida, interferón alfa, interferón Alfa-2b (conjugado PEG), Interleucina-2, Interleucina-11, Intrón A® (interferón alfa-2b), Iressa®, Irinotecán, Isotretinoína, Kidrolase®, Lanacort®, Lapatinib, L-asparaginasa, LCR, Lenalidomida, letrozol, leucovorina, Leukerán, Leukine™, Leuprolida, Leuocristina, Leustatin™, Ara-C liposómico, Pred® líquido, Lomustina, L-PAM, L-Sarcolisina, Lupron®, Lupron Depot®, Matulane®, Maxidex, Mecloretamina, Hidroclicloruro de mecloretamina, Medrol®, Medrol®, Megace®, Megestrol, Acetato de Megestrol, Melfalán, Mercaptopurina, Mesna, Mesnex™, Metotrexato, Metotrexato sódico, Metilprednisolona, Meticorten®, Mitomicina, Mitomicina-C, Mitoxantrona, M-Prednisol®, MTC, MTX, Mustargen®, Mustina, Mutamycin®, Myleran®, Mylocel™, Mylotarg®, Navelbine®, Nelarabina, Neosar®, Neulasta™, Neumega®, Neupogen®, Nexavar®, Nilandron®, Nilutamida, Nipent®, Mostaza de nitrógeno, Novaldex®, Novantrone®, Octreotida, Acetato de octreotida, Oncospar®, Oncovin®, Ontak®, Onxal™, Oprevelcina, Orapred®, Orasone®, Oxaliplatino, un taxol o derivado de taxol por ejemplo Paclitaxel o Paclitaxel enlazado a proteína, Pamidronato, Panitumumab, Panretin®, Paraplatin®, PEDIAPRED®, interferón de PEG, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, PEG-INTRON™, PEG-L-asparaginasa, PEMETREXED, Pentostatina, Mostaza de fenilalanina, Platinol®, Platinol-AQ®, Prednisolona, Prednisona, Prelone®, Procarbazona, PROCIT®, Proleukin®, Prolifeprospan 20 con implante de carmustina, Purinethol®, Raloxifeno, Revlimid®, Rheumatex®, Rituxan®, Rituximab, Roferon-A® (interferón Alfa-2a), Rubex®, Hidroclicloruro de rubidomicina, Sandostatin®, Sandostatin LAR®, Sargramostim, Solu-Cortef®, Solu-Medrol®, Sorafenib, SPRYCEL™, STI-571, Estreptozocina, SU11248, Sunitinib, Sutent®, Tamoxifeno, Tarceva®, Targretin®, Taxol®, Taxotere®, Temodar®, Temozolomida, Teniposida, TESP, Talidomida, Thalomid®, TheraCys®, Tioguanina, Thioguanine Tabloid®, Tiofosfoamida, Thioplex®, Tiotepa, TICE®, Toposar®, Topotecan, Toremifeno, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoína, Trexall™, Trisenox®, tSPA TYKERB®, vCR Vectibix™, Velban®, Velcade®, VePesid®, Vesanoid®, Viadur™, Vidaza®, Vinblastina, Sulfato de vinblastina, Vincasar Pfs®, Vincristina, Vinorelbina, Tartrato de vinorelbina, VLB, VM-26, Vorinostat, VP-16, Vumon®, Xeloda®, Zanosar®, Zevalin™, Zinecard®, Zoladex®, Zoledronato, Zolinza, Zometa®; radiofármacos tales como: Carbono-11, Carbono-14, Cromo-51, Cobalto-57, Cobalto-60, Erbio-169, Flúor-18, Galio-67, Oro-198, Indio-111, Indio-113m, Yodo-123, Yodo-125, Yodo-131, Hierro-59, Criptón-81m, Nitrógeno-13, Oxígeno-15, Fósforo-32, Renio-186, Rubidio-82, Samario-153, Selenio-75, Estroncio-89, Tecnecio-99m, Talio-201, Tritio,

Xenón-127, Xenón-133, Itrio-90 agentes de formación de imágenes tal como gadolinio, magnetita, manganeso, tecnecio, 1125, 1131, P32, TI201, Iopamidol, PET-FDG.

[0072] Otros socios de fusión, socios de conjugación y/o moléculas para inclusión en una nanopartícula, asociado o composición según la invención incluyen: fármacos de acromegalia por ejemplo somatulina, lanreótido, octreótido, Sandostatina; antitrombóticos por ejemplo bivalirudina, Angiomax, dalteparina, Fragmina, enoxaparina, Lovenox, Drotrecogina alfa (por ejemplo Activada), Xigris, heparina; compuestos de terapia reproductiva asistida por ejemplo coriogonadotropina, Ovidrel, follitropina, alfa/beta; enzimas por ejemplo hialuronidasa, Hylenex; fármacos para la diabetes por ejemplo exenatida, Byetta, glucagón, insulina, liraglutida, albiglutida, agonistas de GLP-1, exendina o un análogo de exendina; compuestos útiles en el diagnóstico por ejemplo protirelina, Thyrel TRH Thyphinone, Secretina (por ejemplo humano sintético), Chirhostim, tirotropina (por ejemplo alfa), Thyrogen eritropoiesis fármacos por ejemplo Darbepoetina alfa, Aranesp, Epoetina alfa, Epogen, Eprex, fármacos para el tratamiento de defectos genéticos por ejemplo pegademasa, fármacos para el tratamiento de fallo de crecimiento por ejemplo Adagen, mecasermina, rinfabato, fármacos para el tratamiento de fibrosis cística por ejemplo Dornasa alfa, Pulmozyme, fármacos para el tratamiento de trastornos metabólicos por ejemplo Agalsidasa beta, Fabrazyme, alglucosidasa alfa, Myozyme, Laronidasa, Aldurazyme, fármacos para el tratamiento de verruga genital intralesional por ejemplo interferón alfa-n3, Alferon N, fármacos para el tratamiento de enfermedad granulomatosa por ejemplo interferón gamma-1b, Actimmune; fármacos para el tratamiento de retraso del crecimiento por ejemplo pegvisomant, Somavert, somatotropina, Genotropina, Nutropina, Humatrope, Serostim, Protropina; fármacos para el tratamiento de colapso cardíaco por ejemplo Nesiritida, Natrecor; fármacos para el tratamiento de hemofilia por ejemplo un factor de coagulación por ejemplo Factor VIII, Helixate FS, Kogenate FS, Factor IX, BeneFIX, factor VIIa, Novoseven, Desmopressin, Stimate, DDAVP; fármacos hemopoéticos por ejemplo Filgrastim (G-CSF), Neupogen, Oprelvekin, Neumega, Pegfilgrastim, Neulasta, Sargramostim, Leukine; fármacos para el tratamiento de hepatitis C por ejemplo interferón alfa-2a, Roferón A, Interferón alfa-2b, Intrón A, Interferón alfacon-1, Infergen, Peginterferón alfa-2a, Pegasys, Peginterferón alfa-2b, PEG-intrón; fármacos para el tratamiento de VIH por ejemplo Enfuvirtida, Fuzeon; Fabs por ejemplo Fab (antitrombina), Abciximab, ReoPro; anticuerpos monoclonales por ejemplo Daclizumab, Zenapax; anticuerpos monoclonales antiviricos por ejemplo Palivizumab, Synagis; anticuerpos monoclonales para el tratamiento del asma por ejemplo Omalizumab, Xolair; anticuerpos monoclonales para usar en la formación de imágenes de diagnóstico por ejemplo Arcitumomab, exploración de antígenos carcinoembrionarios, Capromab Pendetide, ProstaScint, Satumomab Pendetide, OncoScint CR/OV, Fabs para usar en la formación de imágenes de diagnóstico por ejemplo Nofetumomab, Verluma; anticuerpos monoclonales inmunosupresores por ejemplo Basiliximab, Simulect, Muromonab-CD3, Orthoclone OKT3; anticuerpos monoclonales para el tratamiento de malignidad por ejemplo Alemtuzumab, Campath, Ibritumomab tiuxetan, Zevalin, Rituximab, Rituxan, Trastuzumab, Herceptin; anticuerpos monoclonales para el tratamiento de artritis reumatoide (AR) por ejemplo Adalimumab, Humira, Infliximab, Remicade; anticuerpos monoclonales para uso como un radioinmunoterapéutico por ejemplo Tositumomab y yodo I¹³¹, Tositumomab, Bexxar; fármacos para el tratamiento de degeneración macular por ejemplo pegaptanib, Macugen; fármacos para el tratamiento de malignidad por ejemplo Aldesleucina, Proleucina, Interleucina-2, Asparaginasa, Elspar, Rasburicasa, Elitek, Denileukin diftotox, Ontak, Pegaspargasa, Oncaspar, goserelina, leuprolida; fármacos para el tratamiento de esclerosis múltiple (MS) por ejemplo acetato de glatirámico (por ejemplo copolímero-1), Copaxone, interferón beta-1a, Avonex, interferón beta-1a, Rebif, interferón beta-1b, Betaseron; fármacos para el tratamiento de mucositis por ejemplo palifermin, Kepivance; fármaco para el tratamiento de distonia por ejemplo, neurotoxina, toxina botulínica tipo A, BOTOX, BOTOX Cosmetic, toxina botulínica tipo B, MYOBLOC; fármacos para el tratamiento de osteoporosis por ejemplo teriparatida, Forteo; fármacos para el tratamiento de psoriasis por ejemplo Alefacept, Amevive; fármacos para el tratamiento de RA por ejemplo abatacept, Orencia, Anakinra, Kineret, Etanercept, Enbrel; trombolíticos por ejemplo Alteplasa, Activasa, rtPA, Anistreplasa, Eminasa, Reteplasa, Retavase, Estreptoquinasa, Estreptasa, Tenecteplasa, TNKase, uroquinasa, Abbocinasa, Kinlytic; fármacos para el tratamiento de osteoporosis por ejemplo calcitonina (por ejemplo salmón), Miacalcin, Fortical, fármacos para el tratamiento de úlceras de la piel por ejemplo Becaplermin, Regranex, colagenasa, Santyl.

[0073] No está claro qué determina la vida media en plasma de conjugados de albúmina, polipéptidos de fusión o asociados (por ejemplo pero no limitado a Levemir®, Kurtzhals P et al. Biochem. J. 1995,312:725-731), pero parece ser un resultado de la combinación de la albúmina y el agente terapéutico seleccionado. Sería deseable poder controlar la vida media en plasma de conjugados de albúmina dados, asociados o polipéptidos de fusión de albúmina de modo que una vida media más larga o más corta de plasma se pueda conseguir que la que se da por los componentes individuales de la asociación, conjugación o fusión, con el objetivo de poder diseñar un fármaco particular según los particulares de la indicación destinados a ser tratados.

[0074] Para ayudar a este diseño la presente invención proporciona un método para valorar una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una variante HSA en comparación con HSA tipo salvaje utilizando un modelo animal no primate. La "farmacocinética" se entiende como la determinación del destino de sustancias administradas externamente a un organismo vivo. Las vías de administración pueden, por

ejemplo, ser oral, enteral (rectal), mucosa o parenteral. Preferiblemente, la administración es parenteral. Vías de administración parenteral preferidas son seleccionadas de, administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o intrapleural. En la presente invención la propiedad farmacocinética preferida o propiedades medidas son seleccionadas de vida media, volumen de distribución, biodisponibilidad, área bajo la curva (AUC), índice de aclaramiento e inmunogenicidad. La propiedad farmacocinética preferida medida en relación con albúmina, variantes y fragmentos de albúmina y modificaciones de la misma es la vida media. La vida media de HSA se mide generalmente por la inyección de un animal modelo subcutáneamente, intramuscularmente o por vía intravenosa con una muestra HSA pertinente (por ejemplo HSA tipo salvaje, o HSA variante o HSA modificada). Para formulaciones dirigidas a la administración oral, enteral (rectal) o mucosa otras vías de administración pueden ser seleccionadas. La dosis se puede variar dependiendo del modelo animal, una dosis entre 1 a 100mg/kg, preferiblemente 5 a 50 mg/kg, preferiblemente de 10 a 40 mg/kg, más preferiblemente de 15 a 30 mg/kg será generalmente apropiada a menos que la molécula sea muy grande luego la dosis puede ser aumentada. Muestras de sangre son recogidas de los animales antes de la inyección y a intervalos posteriores. Los intervalos dependerán del modelo animal ya que se prevé que la vida media varíe con el tamaño del animal (ver tabla 2). Para un ratón, tiempos de muestreo pueden por ejemplo ser 12, 24, 72, 168, 240 y 300 horas post inyección. Para un cerdo los tiempos de muestreo pueden por ejemplo ser 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32 días. La persona experta generalmente conocerá qué tiempos de muestreo son apropiados basándose en las moléculas y el animal. El plasma se puede separar de las muestras y almacenar a -80°C. La cantidad de muestra de HSA restante en el suero se puede analizar por ejemplo por ELISA, espectrometría de masas o Meso escala de descubrimiento (MSD). En resumen, las placas recubiertas con anticuerpo dirigido al agente terapéutico o etiqueta de detección pueden utilizarse para capturar las varias moléculas de albúmina y un anticuerpo de detección secundaria (por ejemplo bien dirigido hacia HSA o epítipo alternativo del agente terapéutico o etiqueta de detección) se añaden para cuantificar la cantidad de HSA presente en la muestra o se pueden utilizar moléculas de albúmina radiomarcadas alternativamente para cuantificar la cantidad de albúmina restante en el suero (en todos los casos los medios de detección no deberían alterar el acoplamiento de la albúmina con el receptor de FcRn en su manera característica. Además, las referencias citadas en la tabla 2 describen varios métodos para medir la vida media de la albúmina en los modelos animales diferentes. Los métodos que usan etiquetado radiactivo de la albúmina son menos preferidos ya que es una modificación adicional a la albúmina o variante y pueden por lo tanto influir en la vida media de la albúmina.

Formas de realización

[0075]

1. Un método para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una HSA variante en comparación con HSA tipo salvaje que comprende
 - a. Selección de un conejo transgénico doble o un roedor transgénico doble donde los transgenes son albúmina humana y un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16;
 - b. Administración de HSA variante a un animal y HSA tipo salvaje a otro animal como conejo o roedor seleccionado en a); y
 - c. Medición de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de HSA variante y HSA tipo salvaje.
2. El método según la forma de realización 1, donde la afinidad de unión de HSA tipo salvaje al FcRn nativo de dicho animal es entre 0.8 y 3.5 veces cuando se comparó con la afinidad de unión de la albúmina nativa de dicho animal.
3. El método según la forma de realización 1 o 2, donde la afinidad de unión es evaluada usando resonancia de plasmón de superficie y un FcRn de animal soluble que comprende una cadena pesada de FcRn y una beta2-globulina desde la misma especie animal.
4. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el FcRn nativo tiene una valina en la posición que corresponde con la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
5. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el FcRn nativo tiene una valina en la posición que corresponde con la posición 52 y una histidina en la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
6. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el animal transgénico es un conejo transgénico doble o un roedor transgénico doble, preferiblemente un ratón, cobaya o rata, y los transgenes son albúmina humana y un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
7. El método según la forma de realización 6 donde el FcRn además tiene una valina en la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
8. El método según la forma de realización 6 o 7, donde el FcRn además tiene un ácido glutámico en la posición 54, una glutamina en la posición 56 y una histidina en la posición 166 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
9. El método según cualquiera de las formas de realización 6 a 8, donde el transgen FcRn es seleccionado de humano, chimpancé, macaco, vaca, cabra, oveja, camello y cerdo.
10. El método según cualquiera de las formas de realización 6 a 8, donde el transgen FcRn es humano.

11. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde la HSA variante y HSA tipo salvaje se modifica por fusión, conjugación o asociación con un socio.
12. El método según la forma de realización 11, donde el socio es un agente terapéutico o una vacuna.
- 5 13. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde una o más (varias) propiedades farmacocinéticas medidas son seleccionadas de vida media, volumen de distribución, AUC, biodisponibilidad, índice de aclaramiento e inmunogenicidad.
14. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde la propiedad farmacocinética medida es vida media.
- 10 15. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde la albúmina se administra subcutáneamente, por vía intramuscular o intravenosa.
16. El método según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde una HSA variante o HSA variante modificada con una o más (varias) propiedades farmacocinéticas mejoradas cuando se compara con HSA tipo salvaje o HSA tipo salvaje modificada, se selecciona para usar en una prueba preclínica.
- 15 17. El método según la forma de realización 16, donde la HSA variante tiene una vida media más larga que HSA tipo salvaje.
18. Una HSA variante seleccionada por el método de cualquiera de las formas de realización 15 a 17.
19. Una HSA variante modificada por fusión, conjugación o asociación con un socio, donde la fusión, conjugación o asociación se selecciona por el método de cualquiera de las formas de realización 15 a 17.
- 20 20. La variante según la forma de realización 19, donde el socio es un agente terapéutico o una vacuna.
21. Uso de un modelo transgénico de conejo o de roedor que expresa un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con SEQ ID N.º: 16 y albúmina humana y que ha sido desactivada para las proteínas nativas correspondientes para comparar una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una molécula de control con una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de una molécula de prueba donde la molécula de control comprende HSA tipo salvaje y la
- 25 22. El uso según la forma de realización 21, donde el FcRn además tiene una valina en la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
23. El uso según la forma de realización 21 o 22, donde el transgen FcRn es seleccionado de humano, chimpancé, macaco, oveja, vacas y cerdo.
- 30 24. El uso según cualquiera de las formas de realización 21 a 23, donde la molécula que comprende HSA tipo salvaje y la molécula que comprende HSA variante además comprende un socio de conjugación, socio de fusión o socio de asociación.
25. El uso según la forma de realización 24, donde el socio es un agente terapéutico o una vacuna.
- 35 26. El uso según cualquiera de las formas de realización 21 a 25, donde se evalúa el efecto en las propiedades farmacocinéticas de un socio seleccionado y el método de unión a la molécula de control y de prueba.
27. El uso según la forma de realización 26, donde la molécula de control es HSA tipo salvaje unida al socio y la molécula de prueba es una HSA variante unida al mismo socio usando el mismo método de unión de las moléculas.
- 40 28. El uso según la forma de realización 26 o 27, donde el socio es un socio de conjugación conjugado en posiciones diferentes en la albúmina (las posiciones son idénticas para tanto la molécula de control como de prueba).
29. El uso según la forma de realización 26 o 28, donde el socio es un socio de conjugación conjugado con tecnologías de conjugación diferentes con la albúmina (la tecnología de conjugación es idéntica para la
- 45 30. El uso según la forma de realización 26 o 28, donde el socio es un socio de fusión fusionado con o sin enlaces diferentes en el extremo C y/o extremo N de la albúmina (los enlazadores son idénticos para la molécula de control y de prueba).
- 50 31. Un conejo transgénico o roedor cuyo genoma comprende una interrupción homocigótica en su gen de cadena pesada FcRn endógeno y gen de albúmina de suero endógeno que previene la expresión de una proteína de FcRn HC funcional de conejo o roedor y albúmina de suero funcional de conejo o de roedor y el genoma comprende además una secuencia de ADN heterólogo que expresa un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 y una secuencia de ADN heterólogo que codifica para suero humano (HSA), y donde el animal expresa una proteína de FcRn HC
- 55 32. Un animal transgénico cuyo genoma comprende una interrupción homocigótica en su gen FcRn HC endógeno y gen de albúmina de suero que previene la expresión de una proteína de FcRn HC funcional de animal y albúmina de suero de animal funcional y el genoma comprende además una secuencia de ADN heterólogo que codifica para FcRn HC humano (hFcRn HC) y una secuencia de ADN heterólogo que codifica para una albúmina de suero humano (HSA), y donde el animal expresa una proteína de hFcRn HC funcional y HSA funcional.
- 60 33. El animal transgénico según la forma de realización 31 o 32, donde el FcRn es 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100% idéntico a la secuencia madura de SEQ ID N.º: 9 o a SEQ ID N.º: 16 y el FcRn HC tiene una histidina en la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
- 65 34. El animal transgénico según la forma de realización 31 o 32, donde el FcRn HC comprende SEQ ID N.º: 16

35. El animal transgénico según cualquiera de las formas de realización 32 a 34, donde la HSA humana es 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100% idéntica a la SEQ ID N.º: 2.

36. El animal transgénico según cualquiera de las formas de realización 32 a 35, donde el animal o roedor es un ratón.

5 37. El animal transgénico según cualquiera de las formas de realización 31 a 36, donde el ADN heterólogo reemplaza al gen endógeno y así lo interrumpe

38. El animal transgénico según cualquiera de las formas de realización 31 a 36, donde la interrupción del gen endógeno se hace independientemente de la inserción del ADN heterólogo, permitiendo que el ADN heterólogo se inserte en una posición diferente del genoma que el gen endógeno.

10

EJEMPLOS

Materiales y métodos

15 [0076] Amine Coupling Kit de GE Healthcare (BR-1000-50) que comprende hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), 1.0 M HCl de etanolamina pH 8.5

Albúminas:

20 [0077] Las albúminas usadas en los presentes ejemplos fueron en la forma madura. Albúmina de suero humano, ratón, conejo y oveja se produjeron recombinantemente utilizando secuencias proporcionadas de bases de datos disponibles públicamente (ver secuencias más abajo) utilizando el método de producción como se describe para las variantes en WO 2012/059486 "métodos 1". Albúminas de suero de perro, cerdo, macaco cangrejero, cobaya y rata fueron preparadas usando los mismos métodos.

25 • albúmina de suero humano tipo salvaje (HSA) (SEQ ID N.º: 1, secuencia madura de aminoácido 25 a 609 también indicada en SEQ ID N.º: 2).

• albúmina de suero de macaco rhesus tipo salvaje (rmSA) (SEQ ID N.º: 3, secuencia madura de aminoácido 25 a 608).

• albúmina de suero de perro tipo salvaje (DSA) (SEQ ID N.º: 4, secuencia madura de aminoácido 25 a 608).

30 • albúmina de suero de cerdo tipo salvaje (PSA) (SEQ ID N.º: 5, secuencia madura de aminoácido 25 a 607).

• albúmina de suero de rata tipo salvaje (RSA) (SEQ ID N.º: 6, secuencia madura de aminoácido 25 a 608).

• albúmina de suero de ratón tipo salvaje (MSA) (SEQ ID N.º: 7, secuencia madura de aminoácido 25 a 608).

• cobaya tipo salvaje (GPSA) (SEQ ID N.º: 18, secuencia madura de aminoácido 25 a 608).

• macaco cangrejero tipo salvaje (CSA) (SEQ ID N.º: 19, secuencia madura de aminoácido 24-608)

35

[0078] Las moléculas de HSA variante fueron generadas por la sustitución de K573 nativo con P, F, W, H o Y o HSA K500 nativa con A. La variante de K500A es conocida por no enlazarse con FcRn humano (un ligante nulo). Las variantes fueron preparadas como se describe en WO 2011/051489 ejemplo 1, método 3 y 4. Las moléculas de HSA variantes con las sustituciones siguientes T83N+N111E+K573P fueron preparadas como se describe en WO 2013/135896 ejemplo 1. La molécula de HSA variante con las sustituciones siguientes E492G+K573P+K574H+Q580K fue preparada como se describe en PCT/EP2013/073426 ejemplo 1, método 2.

40

[0079] Albúmina y variantes de albúmina con una etiqueta c-myc fueron generadas para habilitar la detección de albúmina humana y variantes de albúmina humana en el mono y cerdo ya que los anticuerpos hacia HSA no pueden distinguir rmSA nativa y PSA nativa de HSA. La etiqueta c-myc fue añadida por la fusión del epítipo con la secuencia EQKLISEEDL al extremo N-terminal de la secuencia de albúmina, para detalles véase ejemplo 3.

45

50 Moléculas de FcRn solubles:

[0080] Se han descrito vectores que codifican las versiones truncadas de los tres ectodominios (a1-a3) de cDNA de cadena pesada de FcRn de ratón y humano, fusionados genéticamente a un cDNA que codifica la glutatona S-transferasa de Schistosoma japonicum (GST) (Andersen et al (2008) FEBS J 275(16), 4097-4110; Andersen et al. (2010) J Biol. Chem. 12,285(7): 4826-36, Andersen et al., 2011 J. Biol. Chem.286:5234-5241). Versiones truncadas de los tres ectodominios (a1-a3) de cDNA de FcRn HC de macaco rhesus, rata, cerdo y perro fueron sintetizadas por GenScript, y subclonadas en el mismo sistema de vector utilizando los sitios de restricción XhoI (NEB) e HindIII (NEB). Todos los vectores también contienen un cDNA que codifica β 2-microglobulina humana y el origen de replicación del virus de Epstein-Barr (oriP). Las moléculas de FcRn solubles marcadas por GST fueron producidas en células 293E de riñón embrionario humano adherentes, y los receptores segregados fueron purificados utilizando una columna GSTrap como se describe (Berntzen et al. (2005) J Immunol Methods 298,93-104).

55

60

[0081] Las secuencias proteínicas de las cadenas de FcRn son enumeradas a continuación.

65

• humano (shFcRn) corresponde a los aminoácidos 24 a 291 de SEQ ID N.º: 9

• macaco rhesus (srmFcRn) corresponde a los aminoácidos 22 a 290 de SEQ ID N.º: 10

- cerdo (pFcRn) corresponde a los aminoácidos 23 a 290 de SEQ ID N.º: 11
- perro (dFcRn) corresponde a los aminoácidos 23 a 289 de SEQ ID N.º: 12
- ratón (smFcRn) corresponde a los aminoácidos 21 a 293 de SEQ ID N.º: 13
- rata (srFcRn) corresponde a los aminoácidos 23 a 292 de SEQ ID N.º: 14
- 5 • β 2-microglobulina humana se indica en SEQ ID N.º: 15 (secuencia madura de los aminoácidos 21 a 119).
- cobaya (gpFcRn) corresponde a los aminoácidos 25 a 298 de SEQ ID N.º: 17
- macaco cangrejero (CynoFcRn) corresponde a los aminoácidos 24-297 de SEQ ID N.º: 20. β 2-microglobulina de macaco cangrejero se indica en SEQ ID N.º: 21 (secuencia madura de aminoácidos 21 a 119)
- 10 • β 2-microglobulina de cerdo se indica en SEQ ID N.º: 22 (secuencia madura es de aminoácidos 21 a 118)
- β 2-microglobulina de cobaya se indica en SEQ ID N.º: 23 (secuencia madura de aminoácidos 27 a 125)

Resonancia de plasmón de superficie (SPR):

- 15 [0082] Experimentos de SPR fueron efectuados utilizando un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare). Células de flujo de chips sensores de CM5 fueron acopladas con FcRn soluble de una de las siguientes especies, humano (shFcRn), rata (srFcRn), ratón (smFcRn), macaco rhesus (srmFcRn), perro (dFcRn) o cerdo (pFcRn) (~ 900 - 2500 unidades de resonancia (RU)) usando química de acoplamiento de amina de GE Healthcare según las instrucciones del fabricante. El acoplamiento fue realizado por la inyección de 2 o 10
- 20 μ g/ml de FcRn en 10 mM pH de acetato sódico 5.0 (GE Healthcare). Tampón fosfato (67 mM de tampón fosfato, 0.15 M NaCl, 0.005% Tween 20) a pH 6.0) fue usado como tampón de desplazamiento y búfer de dilución. La regeneración de las superficies se hizo usando inyecciones de tampón HBS-EP (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% tensoactivo P20) a pH 7.4 (GE Healthcare). Para la determinación de la cinética de unión, diluciones en serie de albúmina (10-0.3 μ M) fueron inyectadas sobre receptores
- 25 inmovilizados a un caudal constante (50 μ l/min) a 25 °C. En todos los experimentos, los datos fueron ajustados a cero y la referencia celular sustraída. Índices de asociación (k_a) e índices de disociación (k_d) fueron calculados utilizando un modelo de unión de uno en uno simple (BIAevaluation 4.1 software (BIAcore AB)) (Karlsson et al. (1997). J. Immunol. Methods 200,121-133).

30 Ensayo para cuantificación de modelo animal de albúmina de suero humano

- [0083] Placas para EIA de Maxisorb (Nunc) fueron recubiertas durante toda la noche con anticuerpo de captura anti-c-myc (Abcam ab9132) a 1.25 μ g/mL en suero salino tamponado con fosfato (PBS) lavadas luego 3 veces con 300 μ L PBS+0.05%(v/v) Tween-20 (PBST), pH 7.4. Las placas fueron bloqueadas durante 2h con
- 35 300 μ L PBS + 5%(p/v) de leche desnatada en polvo + 1% (v/v) Tween-20 + 10% (v/v) de suero de rata (Sigma), pH 7.4. Muestras de plasma fueron diluidas 1:10 en PBST luego mezcladas con 10% plasma de citrato sódico de minicerdo de Gottingen o plasma de citrato sódico de macaco cangrejero hembra (catálogo SeraLab nº PSCGOF-444-M-32556 y PSCF-118-M-32555, respectivamente) en PBST. Una curva estándar con una concentración superior de 1000ng/mL y doce puntos de dilución dobles fue incluida en cada placa
- 40 con HSA de c-myc purificada diluida en 10% plasma de minicerdo o plasma de macaco cangrejero en PBST. Placas fueron incubadas a temperatura ambiente (TA) durante 1h luego lavadas como anteriormente. 100 μ l de biotina anti-HSA (Abcam ab81426) a 1.5 μ g/mL en PBST fueron añadidas a cada pozo y las placas fueron incubadas durante 30 min a TA. Las placas fueron lavadas como anteriormente y 100 μ l de 1.25 μ g/mL estreptavidina-HRP (Sigma) en PBST fueron añadidas a cada pozo y las placas fueron incubadas durante 30
- 45 min a TA. Las placas fueron lavadas como anteriormente y la señal fue desarrollada con 100 μ L de sustrato TMB-Ultra (Pierce). La absorbancia fue medida a 450nm utilizando un lector de placas EnSpire Multimode (Perkin Elmer). En ambos casos la curva estándar en cada placa fue equipada en un modelo de regresión no lineal de 4 parámetros y la concentración de HSA en el plasma fue calculada en cada momento utilizando las diluciones que entraron en la gama lineal de la curva estándar.

50

Análisis de PK

- [0084] Los perfiles de concentración en el plasma medios del grupo fueron sometidos a análisis farmacocinético no compartimental usando Phoenix WinNonLin 6.3. Momentos y dosis nominales fueron
- 55 usados y todos los puntos de datos fueron igualmente ponderados en el análisis. Concentraciones medias en plasma versus perfiles temporales para cada una de las variantes de HSA fueron ajustadas con un modelo bicompartimental para generar el ajuste de la curva. Los parámetros farmacocinéticos siguientes fueron evaluados:

- | | | |
|----|-----------|--|
| 60 | C_{max} | La concentración en suero máxima |
| | AUC | Área bajo la curva de concentración en suero de 0 a infinito |
| | $t_{1/2}$ | Vida media de eliminación terminal en el plasma |
| | V_z | Volumen de distribución durante la fase de eliminación |
| | Cl | Aclaramiento total del cuerpo |

65 Ejemplo 1 Cinética de unión de albúminas hacia FcRn de humano, rata, ratón y macaco rhesus

[0085] La afinidad de unión de HSA y HSA variante a FcRn soluble de humano, ratón, rata y macaco rhesus fue analizada y la unión de HSA fue comparada con la unión de la albúmina nativa.

[0086] Los resultados de SPR se muestran en la figura 1 a 4 y la cinética de unión se resumen en la tabla 5.

5

Tabla 5: Cinética de unión de albúminas hacia FcRn de humano, rata, ratón y macaco rhesus

Variante de albúmina	Ka (10 ³ /Ms)	Kd (10 ⁻³ /s)	KD ^a (μM)	KD ^b (μM)
FcRn humano				
HSA tipo salvaje	7.4±0.1	8.40±0.1	1.1	1.2
K573P	4.4±0.1	0.43±0.1	0.097	ND
K573F	7.3±0.2	0.48±0.1	0.065	ND
K573H	7.2±0.0	0.57±0.1	0.079	ND
K573W	4.4±0.1	0.30±0.1	0.068	ND
K573Y	7.4±0.1	0.29±0.1	0.040	ND
K500A	NA	NA	NA	25.0 ^c
FcRn de rata				
HSA tipo salvaje	NA	NA	NA	ND
RSA tipo salvaje	7.6±0.1	26.0±0.0	3.20	4.1
K573P	3.8±0.1	7.7±0.1	2.00	2.3
K573F	5.6±0.1	8.5±0.1	1.50	2.2
K573H	7.0±0.0	19.0±0.2	2.70	2.3
K573W	3.2±0.2	5.7±0.0	1.80	2.9
K573Y	4.8±0.1	4.6±0.1	1.00	2.0
K500A	NA	NA	NA	NA
FcRn de ratón				
HSA tipo salvaje	NA	NA	NA	25.0
MSA tipo salvaje	16.1±0.1	12.2±0.0	0.80	1.0
RSA tipo salvaje	13.0±0.0	34.1±0.1	2.60	2.6
K573P	7.7±0.2	12.2±0.0	1.60	1.7
K573F	12.0±0.1	17.0±0.0	1.40	1.5
K573H	12.1±0.0	28.1±0.2	2.3	2.3
K573W	8.2±0.1	8.4±0.1	1.00	1.4
K573Y	12.3±0.1	8.0±0.0	0.70	0.9
K500A	ND	ND	ND	ND
FcRn de macaco Rhesus				
HSA tipo salvaje	8.9±0.2	16.0±0.1	1.80	ND
RmSA tipo salvaje	5.3±0.2	13.0±0.1	2.4	ND
RSA tipo salvaje	4.5±0.1	10.1±0.2	2.20	ND
MSA tipo salvaje	4.9±0.2	6.6±0.1	1.30	ND
K573P	5.7±0.1	1.3±0.1	0.23	ND
K573F	6.8±0.0	1.4±0.2	0.21	ND
K573H	7.6±0.1	1.8±0.1	0.24	ND
K573W	4.8±0.2	0.8±0.2	0.17	ND
K573Y	6.4±0.1	0.8±0.1	0.12	ND
K500A	ND	ND	ND	ND
a. Las constantes de índice cinético fueron obtenidas utilizando un modelo simple de interacción bimolecular de primer orden (1:1). Los valores cinéticos representan el promedio de duplicados. b. La constante de afinidad de estado estable se obtuvo utilizando un modelo de unión de equilibrio (Req) suministrado por el software BIAevaluation 4.1. c. Los datos son tomados de Andersen et al., Nature Commun., In press ND = no determinado. NA = no adquirido debido a cinética rápida.				

Conclusiones

10 [0087] Todas las variantes de HSA mostraron unión considerablemente mejorada a FcRn humano a pH ácido en comparación con el tipo salvaje, y el aumento fue principalmente debido a índices de disociación más lentos.

15 [0088] HSA se enlaza muy débilmente a FcRn de rata y ratón cuando se compara con las albúminas nativas. Consecuentemente, albúmina de rata o de ratón superará la HSA para la unión de FcRn de rata o ratón. Por esta razón, rata y ratón no son modelos animales deseados para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de HSA *in vivo*. Por otro lado, HSA tiene una afinidad de unión cuantificable

para FcRn de macaco rhesus, y la unión es 1,3 veces mejor que la unión de la albúmina nativa de macaco rhesus. Esto indica que el macaco rhesus es un modelo animal adecuado para estudios farmacocinéticos de HSA y variantes de HSA ya que la albúmina de macaco rhesus nativa no superará la HSA para la unión a FcRn.

5

Ejemplo 2 cinética de unión de albúminas hacia FcRn de perro y cerdo

[0089] En este ejemplo la afinidad de unión de HSA y HSA variante para FcRn de perro y cerdo fue analizada y la unión de HSA fue comparada con la unión de la albúmina nativa.

10

[0090] Los resultados de SPR se muestran en la figura 5 y 6 y la cinética de unión se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Cinética de unión de albúminas hacia FcRn de perro y cerdo

Variante de albúmina	Ka (10 ³ /Ms)	Kd (10 ⁻³ /s)	KD ^a (μM)
FcRn de perro			
HSA tipo salvaje	9.10±0.10	17.0±0.02	1.90
DSA	12.0±0.20	3.40±0.1	0.28
PSA	NA	NA	23.0 ^b
rmSA	1.30±0.10	20.0±0.0	1.54
RSA	8.30±0.00	48.0±0.01	5.80
MSA	7.40±0.10	13.0±0.02	1.75
K573P	8.30±0.10	2.00±0.00	0.24
K573W	6.70±0.20	2.60±0.10	0.38
K573F	9.20±0.00	3.80±0.20	0.41
K573Y	8.10±0.10	2.40±0.10	0.29
K573H	13.0±0.10	5.10±0.00	0.39
HSA K500A	NA	NA	36.0 ^b
FcRn de Cerdo			
HSA tipo salvaje	16.0±0.31	15.0±0.05	0.93
PSA	20.0±0.30	53.0±0.10	2.70
DSA	9.20±0.10	13.0±0.02	1.40
rmSA	10.0±0.20	12.0±0.01	1.20
RSA	11.0±0.20	71.0±0.02	6.40
MSA	10.0±0.10	22.0±0.01	2.20
K573P	9.20±0.10	2.60±0.03	0.28
K573W	8.70±0.20	2.20±0.10	0.25
K573F	10.0±0.10	2.80±0.20	0.28
K573Y	9.80±0.05	2.30±0.02	0.23
K573H	14.0±0.02	3.50±0.01	0.25
HSA K500A	NA	NA	38.0 ^b
a. Las constantes de índice cinético fueron obtenidas utilizando un modelo de interacción bimolecular simple de primer orden (1:1). Los valores cinéticos representan el promedio de duplicados. b. KD estimado basado en mediciones de afinidad de estado estable. NA = no adquirido debido a cinética rápida.			

15

Conclusiones

[0091] HSA se enlaza a FcRn de perro con una afinidad que es 6,8 veces inferior a la afinidad de unión de albúmina de perro nativo. Consecuentemente, es muy posible que la albúmina de perro supere la HSA para FcRn de perro. Por esta razón, el perro no es un modelo animal deseado para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de HSA *in vivo*.

20

[0092] Por otro lado la HSA tiene afinidad de unión a FcRn de cerdo que es 2,9 veces superior a la unión de la albúmina de cerdo nativa. Esto indica que el cerdo es un modelo animal adecuado para estudios farmacocinéticos de HSA y variantes de HSA ya que la albúmina de cerdo nativa, aunque está presente en cantidades en exceso en comparación con HSA, no superará la HSA para la unión de pFcRn.

25

Ejemplo 3 Preparación de HSA marcada con c-myc y variantes de HSA

[0093] HSA y variantes de HSA fueron expresadas utilizando técnicas de biología molecular estándar, tal como se describe en Sambrook, J. y D.W. Russell, 2001 (Molecular Cloning: a laboratory manual, 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y).

30

[0094] El objetivo fue segregar de levadura, albúmina humana tipo salvaje (Wt) y albúminas humanas variantes que incorporan las modificaciones K573P, o E492G+K573P+K574H+Q580K o T83N+N111E+K573P que incorporaron un epítipo c-myc en el extremo N-terminal de la secuencia de albúmina madura. La secreción de levadura fue habilitada por el uso de una secuencia líder prepro, conocida como el líder de fusión modificada (mFL con la secuencia de aminoácidos MKWVFIIVSILFLFSSAIS), incorporando otra modificación en la región pro (aminoácidos RSLD). El líder de fusión modificado (mFL), fue además modificado por la inclusión de la secuencia de aminoácidos EEAEAEAESSRLKR que incluye el sitio de escisión 12568 dibásico (KR) con Kex2p y un epítipo c-myc con la secuencia EQKLISEEDL insertada en el extremo N-terminal de la secuencia de albúmina.

[0095] Todos los cassetes de expresión comprenden el promotor *PRB1* de *S. Cerevisiae* y un terminador *ADH1* de *S. Cerevisiae* modificado (mADHT)

[0096] Los plásmidos que codifican la albúmina tipo salvaje y las variantes han sido previamente descritas (ver referencia en la sección Materiales y Métodos). Los plásmidos fueron digeridos de forma similar hasta finalización con BgIII/SacII y el gran fragmento de 8.585kb aislado y sustituido con el fragmento análogo BgIII/SacII de 0.26kb que codifica la secuencia líder de fusión modificada MKWVFIIVSILFLFSSAYS RSLDEEAEEAESSRLKREQKLISEEDL.

[0097] Los plásmidos de expresión fueron generados *in vivo* (es decir vía recombinación homóloga en *S. Cerevisiae*; una técnica referida como reparación de gaps o clonación *in vivo*- ver Orr-Weaver & Szostak. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:4417-4421). Los plásmidos modificados que comprenden la etiqueta c-myc fueron digeridos hasta la finalización con NsiI/PvuI y los fragmentos de 7.41 kb aislados. 100ng de los 4 fragmentos aislados fueron mezclados individualmente con 100ng de pDB3936 digerido con Acc65I/BamHI (descritos en WO 2010/092135) y usados para transformar directamente una cepa A cir0 de *S. Cerevisiae*. La cepa A es un derivado de DYB7 de *S. Cerevisiae* (Payne et al (2008) Applied and Environmental Microbiology Vol 74(24): 7759-7766) con cuatro copias de PDI integradas en el genoma. La transformación de la cepa A fue conseguida utilizando el Sigma Yeast Transformation kit como se describe en WO2011/051489. El crecimiento de los transformantes de levadura en el cultivo en el matraz de agitación, la preparación de reservas de trehalosa de levadura y fermentación alimentada de la albúmina marcada con c-myc y variantes de albúmina fueron esencialmente hechas como se describe también en WO 2011/051489 ejemplo 1, con la modificación de que la base nitrogenada de levadura del caldo BMMS (0.17% (p/v) sin aminoácido y sulfato de amonio (Difco), 37.8mM sulfato de amonio, 36 mM ácido cítrico, 126mM ortofosfato de hidrógeno disódico pH6.5, 2% (p/v) sacarosa, ajustado a pH 6.5 con NaOH) fue usado en ambos casos. Un segundo paso de purificación de la albúmina marcada con c-myc y variantes de albúmina fue realizado usando cromatografía de matriz de AlbuPure™ (ProMetic BioSciences) seguida de DE-FF como se describe en (Evans et al. (2010) Protein Expression and Purification, Volumen 73, Edición 2, páginas 113-124) seguido de purificación en filtración en gel de alta resoluciónn Sephacryl S200 (GE Healthcare) para reducir el nivel de un líder +2058 Da mal clivado hasta menos del 5% (p/v).

Ejemplo 4 Cinética de unión de albúminas hacia FcRn de cerdo, macaco cangrejero y de cobaya

[0098] En este ejemplo, la afinidad de unión de HSA, albúmina de HSA variante y HSA marcada con c-myc para FcRn de cerdo, macaco cangrejero y cobaya fue analizado y la unión de HSA fue comparada con la unión de la albúmina nativa (cerdo o cobaya).

[0099] El ensayo SPR fue realizado con las variaciones siguientes al ensayo descrito en la sección Materiales y Método:

[0100] Los receptores de FcRn solubles fueron sintetizados por GeneArt y expresados en células HEK. El FcRn soluble contenía una etiqueta de HIS en el C-terminal de la cadena beta en vez de un GST en la cadena pesada y la cadena beta usada fue la cadena beta nativa del animal (ver la sección materiales y método para las secuencias correspondientes). El FcRn soluble fue purificado por una columna His trap seguida de una purificación adicional que utiliza una columna de IgG. El receptor de FcRn soluble fue diluido a 20µg/mL el tampón fosfato usado como tampón de desplazamiento en el ensayo SPR fue a pH 5.5 en vez de pH 6.0. Las albúminas fueron diluidas en el rango de 20µM a 0.156µM y fluyeron a 30µL/min. Se usó 1:1 de modelo de Langmuir y de estado estable.

[0101] La cinética de unión se resume en la tabla 7.

Tabla 7: Cinética de unión de albúminas hacia cerdo y cobaya

Variante de albúmina	Ka (10 ³ /Ms)	Kd (10 ⁻³ /s)	KD µM	Veces > PSA
FcRn de Cerdo				
PSA	-	-	210*	-
HSA tipo salvaje	-	-	232*	0.9
c-myc-HSA tipo salvaje	-	-	468*	0.4

K573P	32.7	62.2	1.9	110
c-myc-K573P	31.2	40.1	1.3	161
T83N+N111E+K573P	60.1	62.5	1.0	210
C-myc-T83N+N111E+K573P	48.8	49.0	1.0	210
E492G+K573P+K574H+Q580K	27.8	12.1	0.4	525
C-myc-E492G+K573P+K574H+Q580K	34.5	13.6	0.4	525
FcRn de macaco cangrejero				
CSA	2.8	98	35	-
HSA tipo salvaje	2.7	108	40	0.9
C-myc-HSA tipo salvaje	2.5	108	43	0.8
K573P	5.1	22	4	8.8
C-myc-K573P	5.7	20	4	8.8
T83N+N111E+K573P	7.6	18	2	17.5
C-myc-T83N+N111E+K573P	7.0	22	3	11.7
E492G+K573P+K574H+Q580K	4.6	5.5	1	35
C-myc-E492G+K573P+K574H+Q580K	4.9	5.9	1	35
gpFcRN				
GPSA	36.2	41.9	1.1	
PSA	NA	NA	NA	
HSA tipo salvaje	NA	NA	NA	
C-myc-HSA	NA	NA	NA	
K573P	1.5	297	190	
C-myc-K573P	0.5	181	360	
T83N+N111E+K573P	0.7	279	410	
C-myc-T83N+N111E+K573P	0.4	216	550	
E492G+K573P+K574H+Q580K	5.8	62.8	10.9	
C-myc-E492G+K573P+K574H+Q580K	5.7	76.8	13	
*KD valores sin cinética fueron determinados usando un modelo estable NA = no adquirido debido a cinética rápida.				

Conclusiones

5 [0102] Afinidades de unión de HSA tipo salvaje y PSA a FcRn de cerdo son comparables. Las afinidades de unión son algo inferiores a lo previsto y se pueden deber a la calidad del receptor soluble que no es tan alta como estaba previsto. La diferencia de 0.9 veces entre la albúmina de cerdo nativo y HSA tipo salvaje sin embargo todavía indica que el cerdo es un modelo animal adecuado para estudios farmacocinéticos de HSA y variantes de HSA puesto que la albúmina de cerdo nativo, aunque está presente en cantidades en exceso en comparación con HSA, no superará la HSA para la unión de pFcRn.

10 [0103] La etiqueta c-myc parece afectar a la unión de HSA tipo salvaje al FcRn de cerdo, sin embargo, a tal baja afinidad (KD alta) cualquier pequeño trastorno en la molécula puede afectar a la unión. Para las variantes de albúmina, la etiqueta c-myc parece mejorar la unión (K573P) o no afectarla. Todas las variantes de HSA se enlazan con FcRn de cerdo con afinidad superior que HSA tipo salvaje y PSA. La variante de HSA T83N+N111E+K573P tiene la asociación más rápida a FcRn de cerdo y la variante de HSA E492G+K573P+K574H+Q580K forma los complejos más estables (índice de disociación más bajo (kd)).

20 [0104] Un estudio comparativo usando FcRn de macaco cangrejero mostró que la afinidad de unión de HSA tipo salvaje es 0,9 veces cuando se compara con la unión de albúmina de macaco cangrejero nativo para FcRn de macaco cangrejero. Esto indica que macaco cangrejero y cerdo son comparables respecto a las proporciones aunque las afinidades de unión como tal son algo más altas para el FcRn de macaco cangrejero, como se ha mencionado anteriormente esto puede sin embargo deberse a FcRn de cerdo de baja calidad en el presente estudio. Las etiquetas c-myc tienen muy poco efecto en la afinidad de unión.

25 [0105] HSA tipo salvaje y SA de cerdo se enlazan muy mal con FcRn de cobaya. La fusión de una etiqueta c-myc a las albúminas parece inhibir el enlace. La SA de cobaya tiene la afinidad máxima para FcRn de cobaya cuando se compara con SA tipo salvaje de cerdo y humano al igual que variantes de albúmina humana. Por esta razón la cobaya no es un modelo animal deseado para la evaluación de una o más (varias) propiedades farmacocinéticas de HSA *in vivo*.

30 Ejemplo 5 Estudio de PK en cerdos

35 [0106] Estudios de PK fueron realizados en 8 minicerdos de Göttingen hembra (Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Sorø Landevej 302, DK-4261 Dalmose). Al principio del periodo de aclimatación los minicerdos tenían aproximadamente 5 meses de edad y un peso corporal de 7.8 - 9.7 kg. Los animales fueron divididos en 4

grupos con 2 animales por grupo. HSA tipo salvaje marcada con c-myc en el extremo N-terminal, variante de albúmina K573P marcada con c-myc en el extremo N-terminal, variante de albúmina E492G+K573P+K574H+Q580K marcada con c-myc en el extremo N-terminal y variante de albúmina T83N+N111E+K573P marcada con c-myc en el extremo N-terminal fueron administradas i.v. por medio de un venflon en una vena de oreja en dos animales en una dosis de 1 mg/kg (0,2 ml/kg) de una solución de dosis de 5 mg/ml según tabla 8:

Tabla 8: tabla de administración de dosis para estudio de PK en cerdos

Grupo n°.	Animal n°.	N° de animales	Compuesto	Vía de admin.	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)
1	1-2	2	HSA tipo salvaje marcada con c-myc en el extremo N-terminal	i.v.	1	0.2
2	3-4	2	Variante de albúmina K573P marcada c-myc en el extremo N-terminal	i.v.	1	0.2
3	5-6	2	Variante de albúmina marcada con c-myc E492G+K573P+K574H+Q580K en el extremo N-terminal	i.v.	1	0.2
4	7-8	2	Variante de albúmina T83N+N111E+K573P marcada con c-myc en el extremo N-terminal	i.v.	1	0.2

[0107] Muestras de sangre de dos ml (2ml) fueron recogidas a partir de una vena yugular en los tubos de ensayo de citrato sódico en los intervalos siguientes: predosis, 0.25, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 360, 408, 456, y 504 horas después de la dosificación. Muestras de sangre fueron mantenidas en hielo hasta max 20 min. antes de la centrifugación a 4°C, 10 min., 2000 G. Plasma fue inmediatamente transferido de cada muestra a tres tubos de 750 µL de Micronic marcados de forma apropiada, aproximadamente 250 µl en cada uno y finalmente el plasma restante compartido entre los tres tubos, y colocados en estanterías. Las muestras de plasma fueron almacenadas a -80°C hasta realizar el ensayo.

Resultados:

[0108] El análisis de PK fue exitoso solo para 4 animales de los 8 animales evaluados como juzgados desde el coeficiente de determinación para la pendiente de fase de eliminación terminal de la curva concentración-tiempo en el plasma, R² (Rsq), que necesita ser superior a 0.85 para obtener estimaciones aceptables de AUC, t_{1/2}, V_z, y CL. El resultado del estudio farmacocinético de los animales 1,2,5 y 7 se muestra en tabla 9.

Tabla 9: parámetros farmacocinéticos de estudio de PK en cerdos

Compuesto	Animal	R ²	Cmax (Ng/ml)	AUC (H.µg/mL)	t _{1/2} (h)	V _z (ml/kg)	Cl (ml/H/kg)
HSA tipo salvaje	1	0.86	16.4	926.12	192.34	299.63	1.08
	2	0.95	9.25	554.03	197.75	514.94	1.8
Media		0.9	12.83	740.08	195.05	407.28	1.44
SD		0.06	5.06	263.11	3.82	152.25	0.51
E492G+K573P+K574H+Q580K	5	0.95	8.55	817.82	354.95	626.15	1.22
T83N+N111E+K573P	7	0.93	10.47	1059.89	333.24	453.6	0.94

Conclusión:

[0109] Las variantes de albúmina humana E492G+K573P+K574H+Q580K y T83N+N111E+K573P mostraron una vida media 1.8 y 1.7 veces más larga, respectivamente, en comparación con albúmina humana tipo salvaje. Esto indica claramente que la extensión de vida media de variantes de albúmina puede ser comparado con la vida media de HSA tipo salvaje y una diferenciación clara en la vida media entre una HSA variante y HSA tipo salvaje se pueden observar con el modelo corriente.

[0110] De manera suficientemente interesante la variante de HSA con la vida media más larga se correlaciona con la variante de HSA que tiene la afinidad de unión más fuerte en el Biacore en el FcRn de cerdo (véase ejemplo 4). Sin embargo, antes de concluir que tal correlación existe hay que tener en cuenta que los datos de PK para las variantes se basan en solo un animal para cada variante.

[0111] La prolongación en la vida media es un resultado de índice de aclaramiento disminuido que a su vez refleja AUC aumentado.

Ejemplo 6 Estudio de PK de macaco cangrejero comparativo

[0112] Los estudios de PK fueron realizados en 8 macacos cangrejero hembra (Huntingdon Life Sciences, Huntingdon Research Centre. Woolley Road, Alconbury. Huntingdon. Cambridgeshire PE28 4HS. UK). Al inicio del periodo de aclimatación los macacos cangrejero tenían 2.5 - 3.0 años de edad y tenían un peso corporal de 2.5 - 3.5kg. Los animales fueron divididos en 4 grupos con 2 animales por grupo. HSA tipo salvaje marcada con c-myc en el extremo N-terminal, la variante K573P de albúmina marcada con c-myc en el extremo N-terminal, la variante E492G+K573P+K574H+Q580K de albúmina marcada con c-myc en el extremo N-terminal y la variante T83N+N111E+K573P de albúmina marcada con c-myc en el extremo N-terminal fueron administradas i.v. por medio de una vena safena para dos animales en una dosis de 1 mg/kg (1 ml/kg) de una solución de dosis de 1 mg/ml según la tabla 10.

Tabla 10: Tabla de administración de dosis para estudio de PK de macaco cangrejero

Grupo n°.	Animal n°.	N° de animales	Compuesto	Vía de admin.	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)
1	412, 414	2	HSA tipo salvaje marcada con c-myc en el extremo N-terminal	i.v.	1	1.0
2	416, 418	2	Variante K573P de albúmina marcada con c-myc en el extremo N-terminal	i.v.	1	1.0
3	420, 422	2	Variante E492G, K573P, K574H, Q580K de albúmina marcada con c-myc en el extremo N-terminal	i.v.	1	1.0
4	424, 426	2	Variante T83N+N111E+K573P de albúmina marcada con c-myc en el extremo N-terminal	i.v.	1	1.0

[0113] Muestras de sangre de 0.8mL fueron extraídas de animales no anestesiados por medio de punción de vena adecuada usando una lanceta estéril en los tubos estándar de HLS con citrato sódico 3.8% (0.13M) en los intervalos siguientes: predosis, 0.25, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192, 240, 288, 336, 384, 432, 480, 528, 576, 624, 720, 816, 912, 1008, 1104 y 1200 horas después de la dosificación. Muestras fueron mezcladas íntegramente por inversión e inmediatamente colocadas en el hielo húmedo para un máximo de 10 minutos antes de centrifugación (2000 x g durante 10 minutos a 4°C). Plasma fue pipetado en tubos de 1.4 mL de Micronic marcados, congelado en el hielo seco y mantenido a -80°C. Las muestras de plasma fueron almacenadas a -80°C hasta que se realizó el ensayo.

Resultados

[0114] Los resultados del estudio farmacocinético se muestran en la tabla 11.

Tabla 11 parámetros farmacocinéticos de estudio de PK de macaco cangrejero

Compuesto	R ²	Cmax (µg/ml)	AUC (H.µg/ml)	t _{1/2} (h)	V _z (ml/kg)	CI (ml/H/kg)
HSA tipo salvaje	0.97	11.48	511.46	133.29	375.98	1.96
	0.98	14.36	573.58	130.2	327.49	1.74
Media	0.97	12.92	542.52	131.76	351.74	1.85
SD	0.004	2.035	43.92	2.19	34.29	0.15
K573P	0.97	11.78	865.94	212.85	354.61	1.15
	0.98	10.32	830.54	208.64	362.42	1.2
Media	0.98	11.05	848.24	210.75	358.52	1.18
SD	0.01	1.03	25.03	2.97	5.52	0.04
E492G+K573P+K574H+Q580K	0.94	10.54	908.44	293.88	466.71	1.1
	0.93	25.51	1560.2	279.04	258.02	0.64
Media	0.94	18.02	1234.32	286.46	362.37	0.87
SD	0.01	10.58	460.86	10.50	147.57	0.33
T83N+N111E+K573P	0.96	12.21	1383.1	339.36	353.98	0.72
	0.92	15.8	1357.29	301.28	320.24	0.74
Media	0.94	14.00	1370.19	320.32	337.11	0.73
SD	0.03	2.54	18.25	26.93	23.86	0.01

Conclusión:

[0115] Las variantes de albúmina humana K573P, E492G+K573P+K574H+Q580K y T83N+N111E+K573P mostraron una vida media 1.6, 2.1 y 2.4 veces más larga, respectivamente, en comparación con albúmina humana tipo salvaje

[0116] La prolongación en la vida media es un resultado de índice de aclaramiento disminuido que a su vez refleja AUC aumentado.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
- [0117]
<110> Novozymes Biopharma DK A/S
Universidad de Oslo
- 10 <120> Modelo de animal farmacocinético
- <130> 12568-WO-PCT
- <150> EP13155554.2
- 15 <151> 2013-02-16
- <150> EP13180587.1
- <151> 2013-08-15
- 20 <160> 23
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 609
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 648 591 T3

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

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys

ES 2 648 591 T3

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605

Leu

<210> 2
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 2

ES 2 648 591 T3

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

ES 2 648 591 T3

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

ES 2 648 591 T3

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 3

<211> 608

<212> PRT

5 <213> Macaca mulatta

<400> 3

ES 2 648 591 T3

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

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu His Phe Lys Gly Leu Val Leu
 35 40 45

Val Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Glu His Val
 50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Pro Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140

ES 2 648 591 T3

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Ala Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Ala Glu Cys
 180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Asp Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp
 290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Leu Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Tyr Val Glu Ser
 325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Met
 355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Ala Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu

ES 2 648 591 T3

<210> 4
<211> 608
<212> PRT
<213> Canis lupus familiaris

5

<400> 4
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Phe Phe Leu Phe Ser Ser Ala

ES 2 648 591 T3

Lys Val Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Thr Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp
 290 295 300

Lys Pro Val Leu Glu Lys Ser Gln Cys Leu Ala Glu Val Glu Arg Asp
 305 310 315 320

Glu Leu Pro Gly Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp
 325 330 335

Lys Glu Val Cys Lys Asn Tyr Gln Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Glu Tyr Ser Val Ser
 355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Glu Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Thr Asp Asp Pro Pro Thr Cys Tyr Ala Lys Val Leu Asp Glu
 385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Val Ser Arg Lys Leu Gly Lys Val Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys
 450 455 460

Pro Glu Ser Glu Arg Met Ser Cys Ala Glu Asp Phe Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

Leu Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Arg
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Ser Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

ES 2 648 591 T3

Ser Gly Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Leu Cys Thr Leu Pro Glu Ala Glu
530 535 540

Lys Gln Val Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Asp Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Gly
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Ala Ala Glu Asn Lys Glu Gly Cys Phe
580 585 590

Ser Glu Glu Gly Pro Lys Leu Val Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Val
595 600 605

<210> 5

<211> 607

<212> PRT

5 <213> Sus scrofa

<400> 5

ES 2 648 591 T3

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Asp	Thr	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala
			20					25					30		
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Gln	Tyr	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu
		35					40					45			
Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	His	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Tyr	Glu	Glu	His	Val
	50					55						60			
Lys	Leu	Val	Arg	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp
65					70					75					80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Ile	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
				85					90					95	
Lys	Leu	Cys	Ala	Ile	Pro	Ser	Leu	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Asp	Leu	Ala
			100					105					110		
Asp	Cys	Cys	Glu	Lys	Glu	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln
		115					120					125			

ES 2 648 591 T3

His Lys Asn Asp Asn Pro Asp Ile Pro Lys Leu Lys Pro Asp Pro Val
 130 135 140

Ala Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Glu Gln Lys Phe Trp Gly Lys
 145 150 155 160

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
 165 170 175

Leu Leu Tyr Tyr Ala Ile Ile Tyr Lys Asp Val Phe Ser Glu Cys Cys
 180 185 190

Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Ile Glu His Leu
 195 200 205

Arg Glu Lys Val Leu Thr Ser Ala Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
 210 215 220

Ser Ile Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ser Leu Ala
 225 230 235 240

Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Asp Phe Thr Glu Ile Ser Lys
 245 250 255

Ile Val Thr Asp Leu Ala Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly Asp
 260 265 270

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 275 280 285

Glu Asn Gln Asp Thr Ile Ser Thr Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp Lys
 290 295 300

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Ala Lys Arg Asp Glu
 305 310 315 320

Leu Pro Ala Asp Leu Asn Pro Leu Glu His Asp Phe Val Glu Asp Lys
 325 330 335

Glu Val Cys Lys Asn Tyr Lys Glu Ala Lys His Val Phe Leu Gly Thr
 340 345 350

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu
 355 360 365

Leu Leu Arg Ile Ala Lys Ile Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Asp Cys Cys
 370 375 380

ES 2 648 591 T3

Ala Lys Glu Asp Pro Pro Ala Cys Tyr Ala Thr Val Phe Asp Lys Phe
385 390 395 400

Gln Pro Leu Val Asp Glu Pro Lys Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
405 410 415

Leu Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val
420 425 430

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
435 440 445

Val Ala Arg Lys Leu Gly Leu Val Gly Ser Arg Cys Cys Lys Arg Pro
450 455 460

Glu Glu Glu Arg Leu Ser Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Leu Val Leu
465 470 475 480

Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val
485 490 495

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
500 505 510

Ala Leu Thr Pro Asp Glu Thr Tyr Lys Pro Lys Glu Phe Val Glu Gly
515 520 525

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Leu Cys Thr Leu Pro Glu Asp Glu Lys
530 535 540

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro
545 550 555 560

His Ala Thr Glu Glu Gln Leu Arg Thr Val Leu Gly Asn Phe Ala Ala
565 570 575

Phe Val Gln Lys Cys Cys Ala Ala Pro Asp His Glu Ala Cys Phe Ala
580 585 590

Val Glu Gly Pro Lys Phe Val Ile Glu Ile Arg Gly Ile Leu Ala
595 600 605

<210> 6
<211> 608
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

5

<400> 6

ES 2 648 591 T3

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

Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Pro Tyr Glu Glu His Ile
50 55 60

Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Asn Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Ile His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Lys Leu Arg Asp Asn Tyr Gly Glu Leu Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Pro Phe Gln Arg Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Gln Glu Asn Pro Thr Ser Phe Leu Gly
145 150 155 160

His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Lys Tyr Asn Glu Val Leu Thr Gln Cys
180 185 190

Cys Thr Glu Ser Asp Lys Ala Ala Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Ala
195 200 205

Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ala Ala Val Arg Gln Arg Met Lys Cys
210 215 220

Ser Ser Met Gln Arg Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Met Ser Gln Arg Phe Pro Asn Ala Glu Phe Ala Glu Ile Thr

ES 2 648 591 T3

				245					250							255
Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Val	Thr	Lys	Ile	Asn	Lys	Glu	Cys	Cys	His	Gly	
			260					265					270			
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Tyr	Met	
		275					280					285				
Cys	Glu	Asn	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Gln	Ala	Cys	Cys	Asp	
	290					295					300					
Lys	Pro	Val	Leu	Gln	Lys	Ser	Gln	Cys	Leu	Ala	Glu	Ile	Glu	His	Asp	
305					310					315					320	
Asn	Ile	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Ile	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Asp	
				325					330					335		
Lys	Glu	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	
			340					345					350			
Thr	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Ser	
		355					360					365				
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Lys	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	
	370					375					380					
Cys	Ala	Glu	Gly	Asp	Pro	Pro	Ala	Cys	Tyr	Gly	Thr	Val	Leu	Ala	Glu	
385					390					395					400	
Phe	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Lys	Thr	Asn	Cys	
				405					410					415		
Glu	Leu	Tyr	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Val	Leu	
			420					425					430			
Val	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	
		435					440					445				
Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Leu	
	450					455					460					
Pro	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Pro	Cys	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ile	
465					470					475					480	
Leu	Asn	Arg	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Lys	
				485					490					495		

ES 2 648 591 T3

Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Lys Glu
 530 535 540

Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Glu Asp Gln Leu Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Ala
 565 570 575

Gln Phe Val Asp Lys Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Asn Cys Phe
 580 585 590

Ala Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Ala Arg Ser Lys Glu Ala Leu Ala
 595 600 605

- <210> 7
- <211> 608
- 5 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 7

ES 2 648 591 T3

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Ala
1				5					10					15	
Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Glu	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala
			20					25					30		
His	Arg	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gly	Glu	Gln	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu
		35					40					45			
Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Lys	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	His	Ala
	50					55						60			
Lys	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp
65					70					75					80
Glu	Ser	Ala	Ala	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
				85					90					95	
Lys	Leu	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ala
			100					105					110		

ES 2 648 591 T3

Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala
 130 135 140
 Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly
 145 150 155 160
 His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys
 180 185 190
 Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly
 195 200 205
 Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys
 210 215 220
 Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr
 245 250 255
 Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp
 305 310 315 320
 Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp
 325 330 335
 Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser
 355 360 365

ES 2 648 591 T3

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu
 385 390 395 400

Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys
 405 410 415

Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu
 450 455 460

Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile
 465 470 475 480

Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu
 530 535 540

Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575

Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe
 580 585 590

Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala
 595 600 605

<210> 8
<211> 608
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 8

ES 2 648 591 T3

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

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Asn Asp Val Gly Glu Glu His Phe Ile Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Thr Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Pro Tyr Glu Glu His Ala
50 55 60

Lys Leu Val Lys Glu Val Thr Asp Leu Ala Lys Ala Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Asp Ile Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Ile Cys Ala Leu Pro Ser Leu Arg Asp Thr Tyr Gly Asp Val Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Glu Lys Lys Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu His
115 120 125

His Lys Asp Asp Lys Pro Asp Leu Pro Pro Phe Ala Arg Pro Glu Ala
130 135 140

Asp Val Leu Cys Lys Ala Phe His Asp Asp Glu Lys Ala Phe Phe Gly
145 150 155 160

His Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Gln Lys Tyr Lys Ala Ile Leu Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Glu Ala Ala Asp Lys Gly Ala Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Ala
195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Leu Ile Ser Ala Ala Gln Glu Arg Leu Arg Cys
210 215 220

Ala Ser Ile Gln Lys Phe Gly Asp Arg Ala Tyr Lys Ala Trp Ala Leu
225 230 235 240

ES 2 648 591 T3

Val Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Asp Phe Thr Asp Ile Ser
 245 250 255

Lys Ile Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285

Cys Glu His Gln Glu Thr Ile Ser Ser His Leu Lys Glu Cys Cys Asp
 290 295 300

Lys Pro Ile Leu Glu Lys Ala His Cys Ile Tyr Gly Leu His Asn Asp
 305 310 315 320

Glu Thr Pro Ala Gly Leu Pro Ala Val Ala Glu Glu Phe Val Glu Asp
 325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Glu Glu Ala Lys Asp Leu Phe Leu Gly
 340 345 350

Lys Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Gly Lys Ala Tyr Glu Ala Thr Leu Lys Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Thr Asp Asp Pro His Ala Cys Tyr Ala Lys Val Leu Asp Glu
 385 390 395 400

Phe Gln Pro Leu Val Asp Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Gln Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Tyr Glu Gln Leu Gly Asp Tyr Asn Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460

Pro Glu Ala Glu Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

Leu Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys

ES 2 648 591 T3

				485					490					495		
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Ser	Glu	Ser	Leu	Val	Asp	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	
			500					505					510			
Ser	Ala	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	
		515					520					525				
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr	Glu	
	530					535					540					
Arg	Lys	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	
545					550					555					560	
Pro	His	Ala	Thr	Asn	Asp	Gln	Leu	Lys	Thr	Val	Val	Gly	Glu	Phe	Thr	
				565					570					575		
Ala	Leu	Leu	Asp	Lys	Cys	Cys	Ser	Ala	Glu	Asp	Lys	Glu	Ala	Cys	Phe	
			580					585					590			
Ala	Val	Glu	Gly	Pro	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Gly	
		595					600					605				

<210> 9
 <211> 365
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 9

ES 2 648 591 T3

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30

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

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
 65 70 75 80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
 85 90 95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr

ES 2 648 591 T3

			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				

ES 2 648 591 T3

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
355 360 365

<210> 10

<211> 365

<212> PRT

5 <213> Macaca mulatta

<400> 10

ES 2 648 591 T3

Met Arg 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 Asp Ser Leu
50 55 60

Arg Gly Gln 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 Ser 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

ES 2 648 591 T3

Ala Arg Pro Gly Asn 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 Met
 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 Thr 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 Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
 325 330 335

Gly Asp Asp Thr Gly Ser Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
 340 345 350

Ala Asp Ser Lys Asp Ile Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
 355 360 365

<210> 11
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

5

<400> 11

ES 2 648 591 T3

Met Arg Ser Pro Gly Ser Ala Leu Val Ala Arg Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Pro Arg Ala Asp Asn His Arg Ser Leu Leu Tyr His
20 25 30

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

Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Arg
50 55 60

ES 2 648 591 T3

Ala Gln Ala Glu Pro Tyr Gly Ala Trp Val Trp Glu Ser Gln Val Ser
65 70 75 80

Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Ala Asp Leu Arg Asn Lys Gln Lys Leu
85 90 95

Phe Leu Glu Ala Leu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Gly Pro Phe Thr Leu
100 105 110

Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Val Ser Val Pro
115 120 125

Val Ala Thr Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Lys Phe Asp Thr
130 135 140

Lys Leu Gly Thr Trp Asp Gly Glu Trp Pro Glu Ala Arg Thr Ile Gly
145 150 155 160

Ser Lys Trp Met Gln Glu Pro Asp Ala Val Asn Lys Glu Lys Thr Phe
165 170 175

Leu Leu Tyr Ser Cys Pro His Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg Gly
180 185 190

Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Met Lys Ala
195 200 205

Arg Pro Gly Thr Ala Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ile 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 Ser Gly Glu Ser Asp Ile Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser
245 250 255

Phe His Ala Trp Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
260 265 270

Tyr Cys Cys Val Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr Val
275 280 285

Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Met Pro Val Val Gly Ile Met
290 295 300

Val Gly Phe Leu Leu Leu Leu Ile Val Ala Gly Gly Gly Ala Leu Leu
305 310 315 320

ES 2 648 591 T3

Trp Arg Arg Met Thr Lys Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Phe His
325 330 335

Gly Gly Arg Arg Arg Gly Pro Pro Ala His Pro Arg Pro Gly Gln Gly
340 345 350

Cys Leu Asn Leu Arg Ile
355

<210> 12

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Canis lupus familiaris

<400> 12

ES 2 648 591 T3

Met Gly Val Pro Arg Pro Arg Ser Trp Gly Leu Gly Phe Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Pro Thr Leu Arg Ala Asp Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His
20 25 30

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

Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Arg
50 55 60

Ala Gln Ala Glu Pro Tyr Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser
65 70 75 80

Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Thr Lys Glu Gly Leu
85 90 95

Phe Leu Glu Ala Leu Lys Ala Leu Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Thr Leu
100 105 110

Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro
115 120 125

Val Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Asp Phe Met Thr Phe Asp Pro
130 135 140

Lys Leu Gly Thr Trp Asn Gly Asp Trp Pro Glu Thr Glu Thr Val Ser
145 150 155 160

Lys Arg Trp Met Gln Gln Ala Gly Ala Val Ser Lys Glu Arg Thr Phe
165 170 175

ES 2 648 591 T3

Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Gln Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg Gly
 180 185 190

Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala
 195 200 205

Arg Pro Gly Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser
 210 215 220

Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala
 225 230 235 240

Ala Gly Ser Gly Glu Gly Asp Phe Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser Phe
 245 250 255

His Ala Trp Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr
 260 265 270

Arg Cys Leu Val Gln His Ala Gly Leu Pro Gln Pro Leu Thr Val Glu
 275 280 285

Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile Val Ile
 290 295 300

Gly Phe Leu Leu Leu Thr Ala Val Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu Trp
 305 310 315 320

Arg Arg Met Arg Lys Gly Leu Pro Ala Pro Trp Met Ser Leu Arg Gly
 325 330 335

Asp Asp Val Gly Ala Leu Leu Pro Thr Pro Gly Val Pro Lys Asp Ala
 340 345 350

Asp Ser

<210> 13

<211> 365

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 13

ES 2 648 591 T3

Met Gly Met Pro Leu Pro Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Pro Gln Thr Trp Gly Ser Glu Thr Arg Pro Pro Leu Met Tyr His Leu
20 25 30

ES 2 648 591 T3

Thr Ala Val Ser Asn Pro Ser Thr Gly Leu Pro Ser Phe Trp Ala Thr
 35 40 45
 Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Ser Leu Arg Gln
 50 55 60
 Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Met Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp
 65 70 75 80
 Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Glu Ala Leu Lys Thr Leu Glu Lys Ile Leu Asn Gly Thr Tyr Thr
 100 105 110
 Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Ser Asp Asn Ser Ser Val
 115 120 125
 Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Lys Phe Asn
 130 135 140
 Pro Arg Ile Gly Asn Trp Thr Gly Glu Trp Pro Glu Thr Glu Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Asp Ala Ala Arg Lys Glu Ser Glu
 165 170 175
 Phe Leu Leu Asn Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg
 180 185 190
 Gly Arg Arg Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205
 Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala Phe
 210 215 220
 Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His His
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr Val
 275 280 285

ES 2 648 591 T3

Asp Leu Asp Ser Ser Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile Val
290 295 300

Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu Leu
305 310 315 320

Trp Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu Ser
325 330 335

Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro Glu
340 345 350

Ala Glu Pro Gln Gly Ala Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
355 360 365

<210> 14

<211> 366

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 14

ES 2 648 591 T3

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

Leu Pro Gln Thr Trp Gly Ala Glu Pro Arg Leu Pro Leu Met Tyr His
 20 25 30

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

Thr Gly Trp Leu Gly Ala Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Asn Leu Arg
 50 55 60

Gln Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Ile Trp Glu Asn Gln Val Ser
 65 70 75 80

Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu
 85 90 95

Phe Leu Glu Ala Ile Arg Thr Leu Glu Asn Gln Ile Asn Gly Thr Phe
 100 105 110

Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Pro Asp Asn Ser Ser
 115 120 125

Leu Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Arg Phe
 130 135 140

ES 2 648 591 T3

Asn Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ser Gly Glu Trp Pro Glu Thr Asp Ile
 145 150 155 160
 Val Gly Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Glu Ala Ala Arg Lys Glu Ser
 165 170 175
 Glu Phe Leu Leu Thr Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu
 180 185 190
 Arg Gly Arg Gln Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu
 195 200 205
 Lys Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala
 210 215 220
 Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly
 225 230 235 240
 Leu Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly
 245 250 255
 Ser Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His
 260 265 270
 His Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr
 275 280 285
 Val Asp Leu Asp Ser Pro Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile
 290 295 300
 Ile Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Trp Asn Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu
 325 330 335
 Ser Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro
 340 345 350
 Glu Ala Glu Pro Gln Gly Val Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
 355 360 365

ES 2 648 591 T3

<210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15
Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 16
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 16

ES 2 648 591 T3

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
 20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
 35 40 45

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
 50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
 65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
 85 90 95

ES 2 648 591 T3

Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
 100 105 110

Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
 115 120 125

Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
 130 135 140

Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
 145 150 155 160

His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
 165 170 175

Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
 180 185 190

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
 195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
 210 215 220

Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
 245 250 255

Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys
 260 265 270

Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr
 275 280 285

Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly
 290 295 300

Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu
 305 310 315 320

Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn
 325 330 335

Val Ile Pro Ala Thr Ala

340

<210> 17

<211> 354

<212> PRT

5 <213> *Cavia porcellus*

<400> 17

ES 2 648 591 T3

Met Gly Glu Pro Gly Pro Pro Arg Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Gln Thr Trp Gly Ala Glu Asn His Leu Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Pro Ala Phe
35 40 45

Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Ser Ser
50 55 60

Leu Arg Arg Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Thr Gln
65 70 75 80

Val Ser Trp Tyr Trp Glu Met Glu Thr Thr Asp Leu Lys Asn Lys Glu
85 90 95

Ser Leu Phe Leu Glu Ala Leu Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr
100 105 110

Thr Leu Gln Gly Ile Leu Gly Cys Glu Leu Ser Pro Asp Asn Ser Ser
115 120 125

Val Pro Thr Ala Leu Phe Ala Leu Asn Gly Glu Asp Phe Met Glu Phe
130 135 140

His Pro Glu Asn Gly Ser Trp Thr Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ser
145 150 155 160

Ile Ser Lys Gln Trp Glu Lys Lys Ala Glu Val Val Ser Lys Glu Lys
165 170 175

Thr Phe Leu Leu Ser Ser Cys Pro Gln Arg Leu Leu Asp His Leu Glu
180 185 190

Arg Ser Arg Arg Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu
195 200 205

Lys Ala Arg Pro Gly Asp Ala Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala

ES 2 648 591 T3

210		215		220											
Phe	Ser	Phe	Tyr	Pro	Pro	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Phe	Leu	His	Asn	Gly
225					230					235					240
Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Glu	Gly	Gly	Phe	Gly	Pro	Asn	Gly	Asp	Gly
				245					250					255	
Ser	Phe	His	Ala	Trp	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Glu	His
			260					265					270		
Asn	Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Gln	His	Ala	Gly	Leu	Pro	Gln	Pro	Leu	Ser
		275					280					285			
Val	Glu	Leu	Glu	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Ser	Val	Pro	Ile	Val	Gly	Ile
	290					295					300				
Val	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Leu
305					310					315					320
Leu	Trp	Arg	Arg	Met	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Trp	Ile	Ser	Leu
				325					330					335	
Arg	Gly	Asp	Asp	Val	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Pro	Leu	Gln	Glu	Pro
			340					345					350		

Asp Ser

<210> 18

<211> 608

<212> PRT

5 <213> Cavia porcellus

<400> 18

ES 2 648 591 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Val
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Asn Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Thr Leu Ser Gln His Leu Gln Lys Ser Pro Phe Glu Glu His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Ala Cys Val Ala Asp

ES 2 648 591 T3

65					70					75					80
Glu	Ser	Ala	Gln	Asn	Cys	Gly	Lys	Ala	Ile	Ala	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
				85					90					95	
Lys	Val	Cys	Ala	Ile	Pro	Ser	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ala
			100					105					110		
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Glu	Asp	Pro	Asp	Arg	Val	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln
			115					120					125		
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Arg	Pro	Glu	Pro
	130						135				140				
Glu	Ala	Leu	Cys	Thr	Ala	Phe	Lys	Glu	Asn	Asn	Asp	Arg	Phe	Ile	Gly
145					150					155					160
His	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Val	Ser	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro
				165					170					175	
Glu	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Leu	Thr	Glu	Cys
			180					185						190	
Cys	Glu	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Thr	Pro	Lys	Leu	Asp	Ala
		195					200							205	
Ile	Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Ser	Ser	Ala	Gln	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys
	210						215					220			
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ser	Val
225						230					235				240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Lys	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Ile	Ser
				245					250					255	
Thr	Ile	Val	Thr	Ser	Leu	Thr	Lys	Val	Thr	Lys	Glu	Cys	Cys	His	Gly
			260					265						270	
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Gln	Glu	Leu	Ala	Lys	Tyr	Met
		275					280					285			
Cys	Glu	His	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Val
	290						295					300			
Lys	Pro	Thr	Leu	Gln	Lys	Ala	His	Cys	Ile	Leu	Glu	Ile	Gln	Arg	Asp
305						310					315				320

ES 2 648 591 T3

Glu Leu Pro Thr Glu Leu Pro Asp Leu Ala Val Asp Phe Val Glu Asp
 325 330 335

Lys Glu Val Cys Lys Asn Phe Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Glu Tyr Ser Ile Gly
 355 360 365

Met Leu Leu Arg Ile Ala Lys Gly Tyr Glu Ala Lys Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Glu Ala Asp Pro His Ala Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400

Leu Gln Pro Leu Ile Asp Glu Pro Lys Lys Leu Val Gln Gln Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Phe Asp Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ala
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Tyr Ala Arg Lys Leu Gly Ser Val Gly Thr Lys Cys Cys Ser Leu
 450 455 460

Pro Glu Thr Glu Arg Leu Ser Cys Thr Glu Asn Tyr Leu Ala Leu Ile
 465 470 475 480

Leu Asn Arg Leu Cys Ile Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Arg
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu His Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Pro Phe His Ala
 515 520 525

Asp Ser Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu
 530 535 540

Lys Gln Val Lys Lys Gln Met Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Ser Glu Glu Gln Met Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Ala
 565 570 575

ES 2 648 591 T3

Ala Phe Leu Lys Lys Cys Cys Asp Ala Asp Asn Lys Glu Ala Cys Phe
580 585 590

Thr Glu Asp Gly Pro Lys Leu Val Ala Lys Cys Gln Ala Thr Leu Ala
595 600 605

<210> 19

<211> 608

<212> PRT

5 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 19

ES 2 648 591 T3

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

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu His Phe Lys Gly Leu Val Leu
 35 40 45

Val Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Glu His Val
 50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Pro Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Ala Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Ala Glu Cys
 180 185 190

ES 2 648 591 T3

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Asp Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Leu Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Tyr Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Met
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Ala Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Val Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

ES 2 648 591 T3

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ala Lys Cys Cys Lys Leu
 450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

Leu Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Glu Leu Asp Glu Ala Tyr Val Pro Lys Ala Phe Asn Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Met Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540

Lys Gln Val Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Gly Val Met Asp Asn Phe Ala
 565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Ala Cys Phe
 580 585 590

Ala Glu Glu Gly Pro Lys Phe Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Ala
 595 600 605

- <210> 20
- <211> 365
- 5 <212> PRT
- <213> *Macaca fascicularis*
- <400> 20

ES 2 648 591 T3

Met Arg 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 Asp Ser Leu
50 55 60

ES 2 648 591 T3

Arg Gly Gln 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 Ser 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 Gly Asn 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 Met
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 Thr 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

ES 2 648 591 T3

Gly Leu Asp Ala Val Ala Arg Pro Pro Lys Val Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Pro Asn Tyr Leu Asn Cys Tyr Val Ser
 35 40 45

Gly Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50 55 60

Lys Met Asn Ala Glu Gln Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser
 65 70 75 80

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

Tyr Ser Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Asp Lys Pro Lys Ile Val
 100 105 110

Lys Trp Asp Arg Asp His
 115

<210> 23

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Cavia porcellus

<400> 23

ES 2 648 591 T3

Met	Ala	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Leu
1				5					10					15	
Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Leu	His	Ala	Pro	Arg
			20					25					30		
Val	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Ala	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln	Asn	Phe
		35					40					45			
Ile	Asn	Cys	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	His	Pro	Pro	Gln	Ile	Glu	Val	Glu
	50					55					60				
Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Lys	Lys	Ile	Asp	Asn	Val	Glu	Met	Ser	Asp	Leu
65					70					75					80
Ser	Phe	Ser	Lys	Asp	Trp	Thr	Phe	Tyr	Leu	Leu	Val	His	Ala	Ala	Phe
				85					90					95	
Thr	Pro	Asn	Asp	Ser	Asp	Glu	Tyr	Ser	Cys	Arg	Val	Ser	His	Ile	Thr
			100					105					110		

REIVINDICACIONES

1. Método para la evaluación de una o más propiedades farmacocinéticas de una HSA variante en comparación con HSA tipo salvaje que comprende
- 5 a. seleccionar un conejo transgénico doble o un roedor transgénico doble donde los transgenes son albúmina humana y un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16;
- b. administrar la HSA variante a un animal y la HSA tipo salvaje a otro animal de conejo o roedor seleccionado en (a); y
- 10 c. medir la una o más propiedades farmacocinéticas de la HSA variante y la HSA tipo salvaje.
2. Método según la reivindicación 1, donde el FcRn nativo tiene una valina en la posición que corresponde con la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, donde el roedor transgénico doble es un ratón, cobaya o rata.
4. Método según la reivindicación 3, donde el FcRn además tiene una valina en la posición 52 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16.
- 20 5. Método según la reivindicación 3 o 4, donde el transgen FcRn es seleccionado de humano, chimpancé, macaco, vaca, cabra, oveja, camello y cerdo.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la HSA variante y HSA tipo salvaje se modifica por fusión, conjugación o asociación con un socio, tal como un agente terapéutico.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una HSA variante o HSA variante modificada con una o más propiedades farmacocinéticas mejoradas cuando se compara con HSA tipo salvaje o HSA tipo salvaje modificada, se selecciona para usar en una prueba preclínica.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, donde la HSA variante tiene una vida media más larga que HSA tipo salvaje.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la HSA variante comprende una sustitución, inserción y/o deleción con respecto a HSA tipo salvaje.
- 35 10. Uso de un modelo transgénico de conejo o de roedor que expresa un FcRn con una histidina en la posición que corresponde con la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 y albúmina humana y que se ha desactivado para las proteínas nativas correspondientes para comparar una o más propiedades farmacocinéticas de una molécula de control con una o más propiedades farmacocinéticas de una molécula de prueba donde la molécula de control comprende HSA tipo salvaje y la molécula de prueba comprende una variante de HSA.
- 40 11. Uso según la reivindicación 10, donde la molécula que comprende HSA tipo salvaje y la molécula que comprende HSA variante además comprenden un socio de conjugación, socio de fusión o socio de asociación, tal como un agente terapéutico.
- 45 12. Uso según la reivindicación 10 u 11, donde se evalúa el efecto en las propiedades farmacocinéticas de un socio seleccionado y el método para unirlo a la molécula de control y de prueba.
- 50 13. Uso según la reivindicación 12, donde el socio es un socio de fusión fusionado con o sin enlaces diferentes en el extremo C-terminal y/o N-terminal de la albúmina (los enlazadores son idénticos para la molécula de control y de prueba).
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la HSA variante comprende una sustitución, inserción y/o deleción con respecto a HSA tipo salvaje.
- 55 15. Animal transgénico de conejo o de roedor cuyo genoma comprende una interrupción homocigótica en su gen endógeno FcRn HC y gen de albúmina de suero que previene la expresión de una proteína de FcRn HC de animal funcional y albúmina de suero de animal funcional y el genoma comprende además una secuencia de ADN heterólogo que codifica un FcRn HC humano (hFcRn HC) que es al menos 90% idéntico a la SEQ ID N.º: 16 y tiene una histidina en la posición 161 cuando se alinea con la SEQ ID N.º: 16 y una secuencia de ADN heterólogo que codifica la albúmina de suero humano que es al menos 95% idéntico a la SEQ ID N.º: 2, y donde el animal expresa una proteína hFcRn HC funcional y HSA funcional.
- 60 16. Animal transgénico según la reivindicación 15, donde el animal es un ratón.
- 65

Figura 1

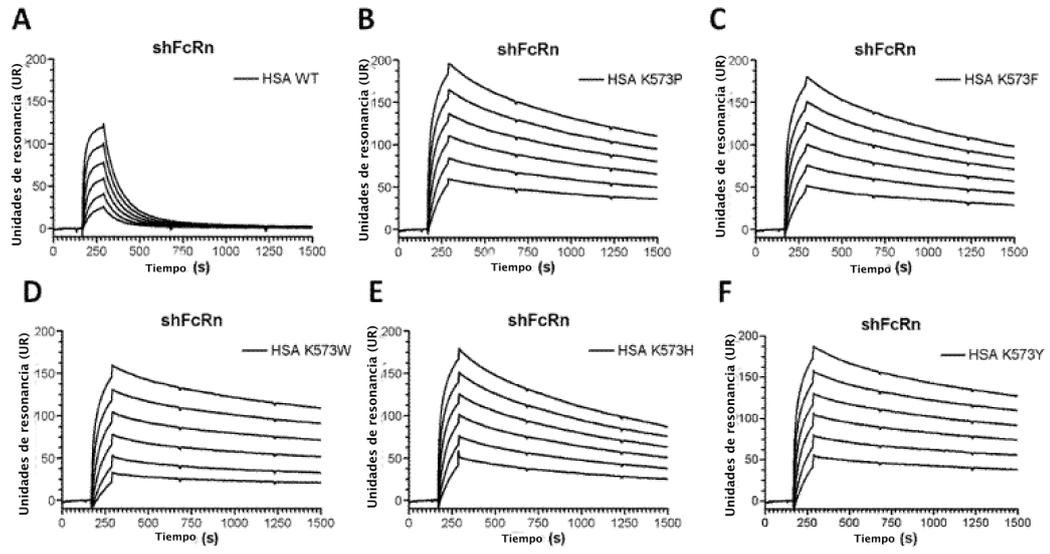


Figura 2

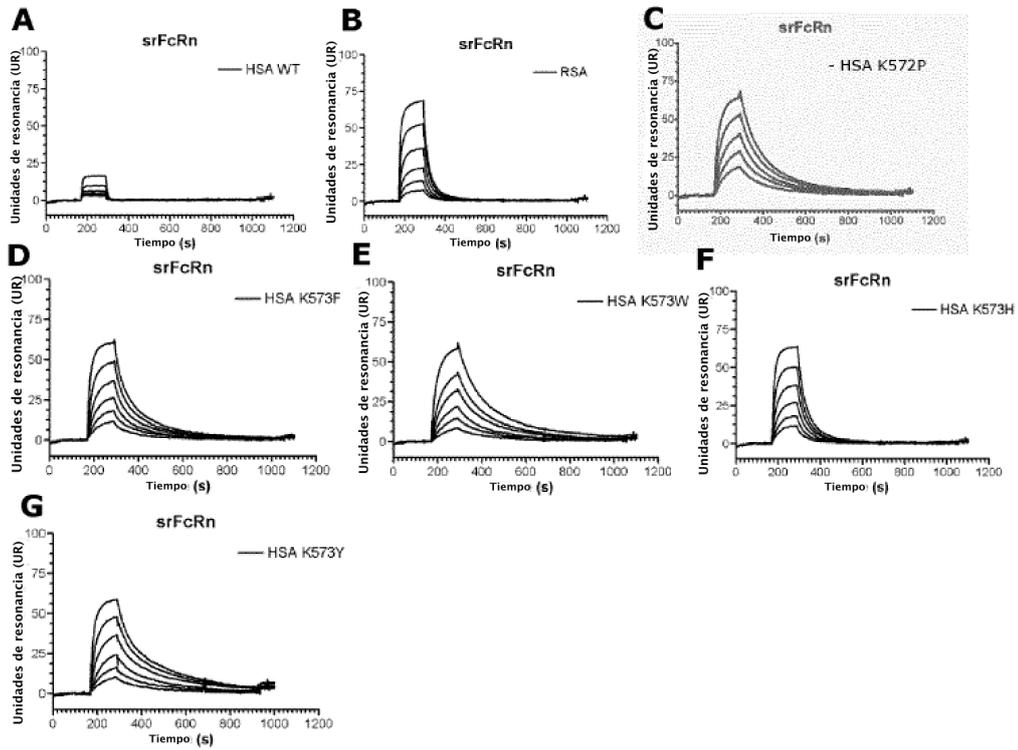


Figura 3

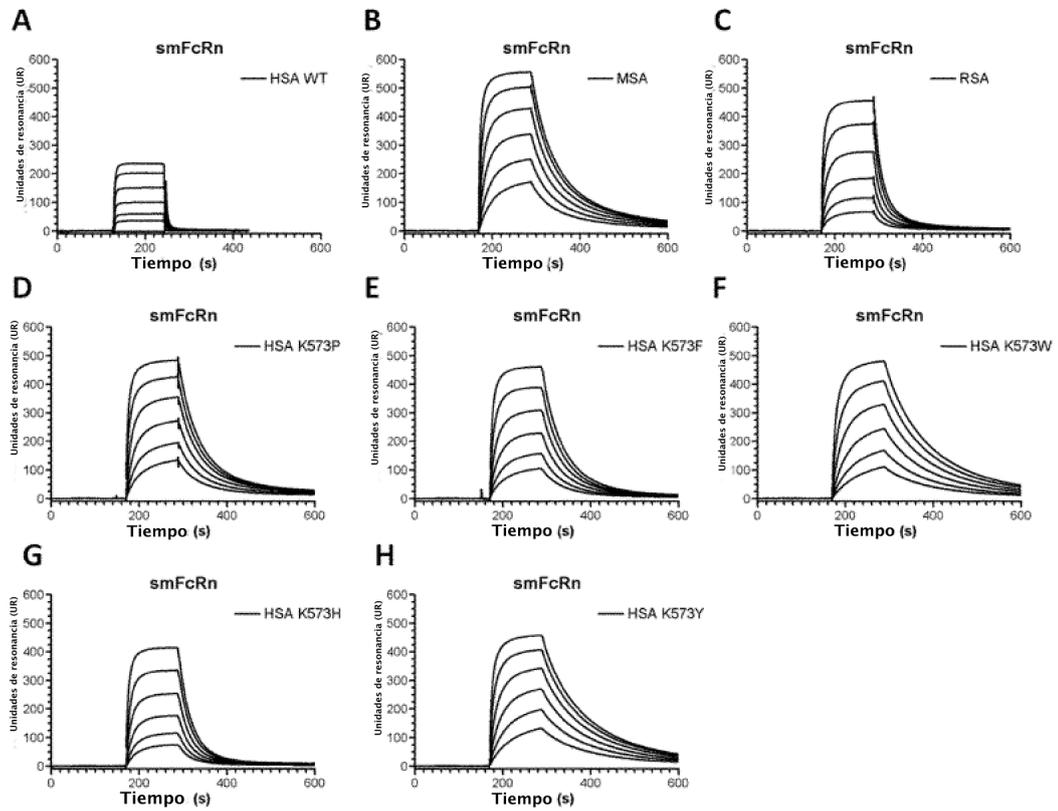


Figura 4

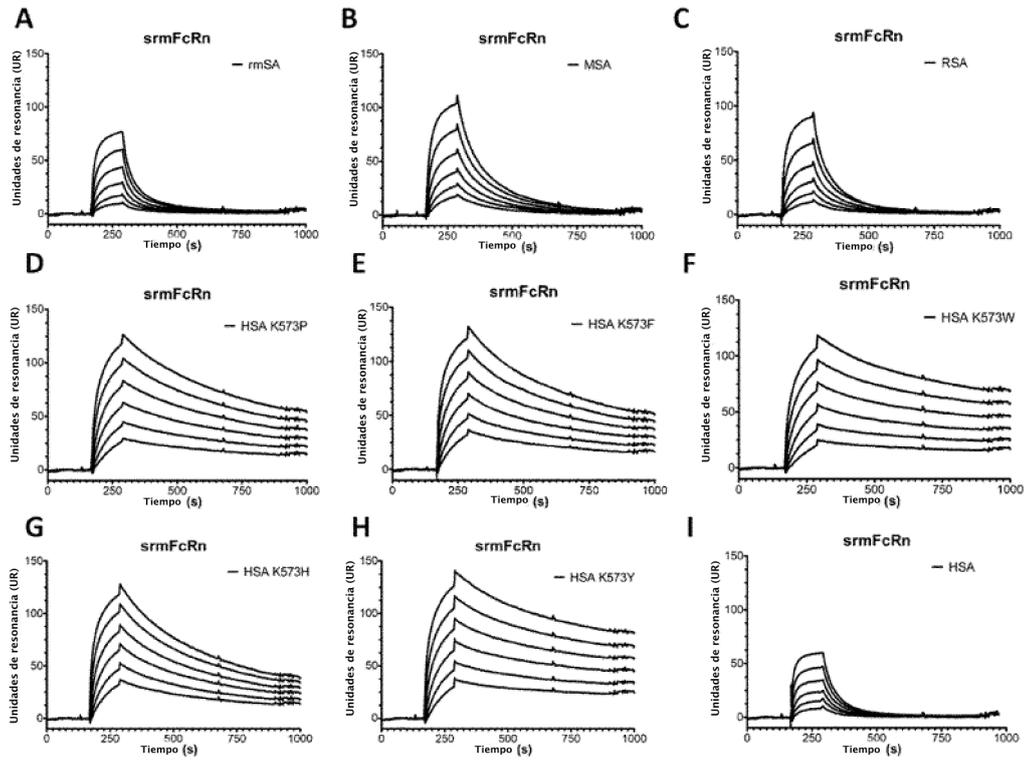


Figura 5

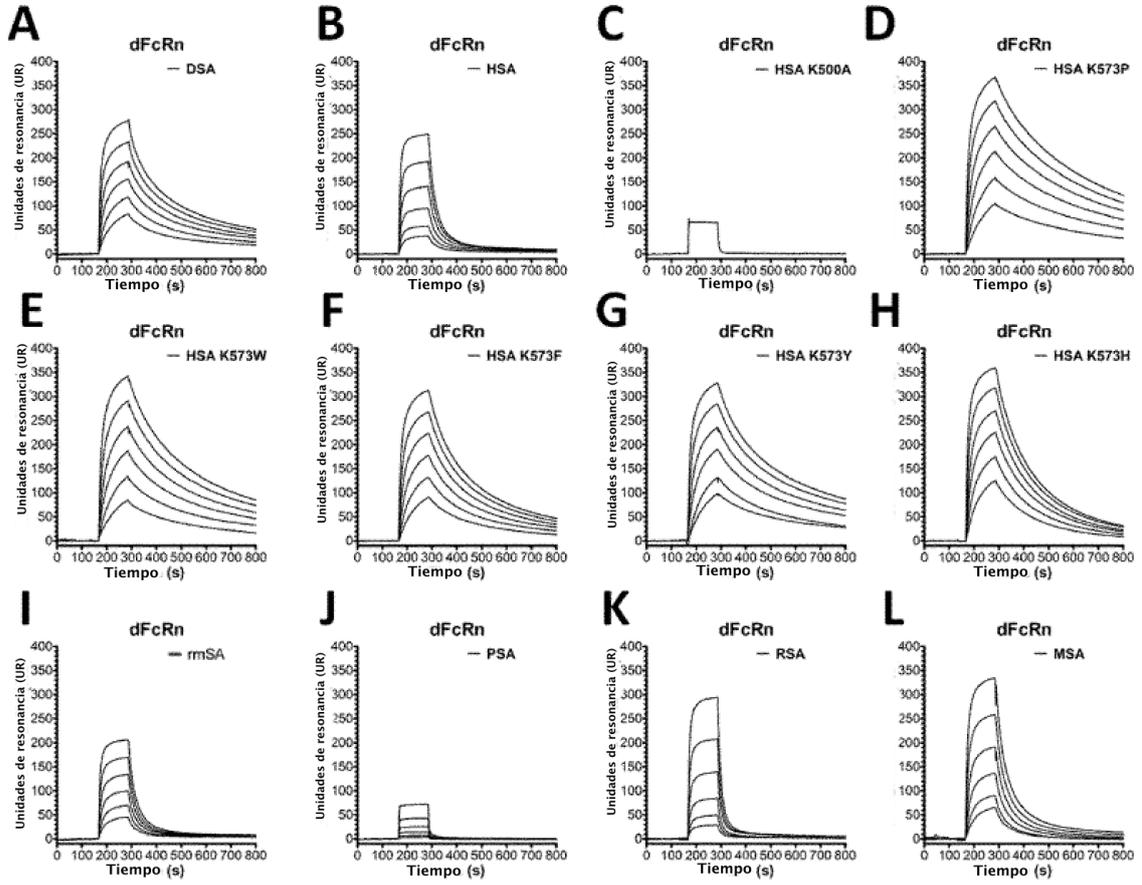


Figura 6

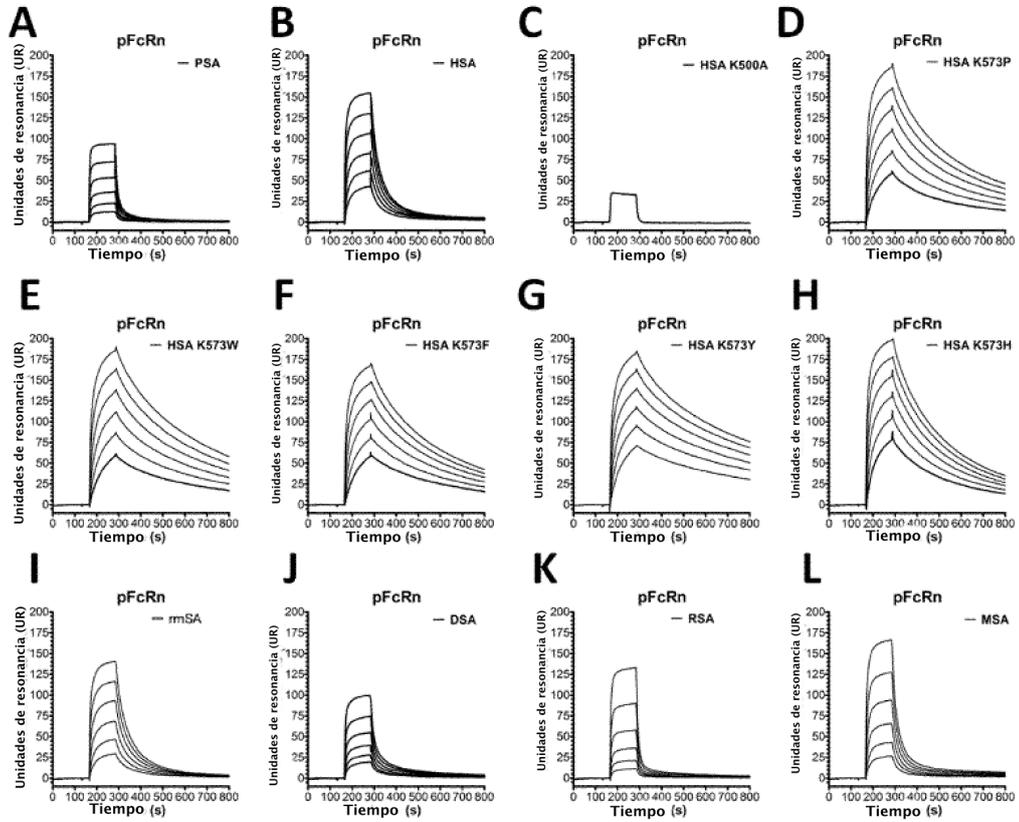


Figura 7

	52	161
humano	AW V WENQVSWYW...	CP H RRLREHLER
macaco	AW V WENQVSWYW...	CP H RRLREHLER
vaca	AW V WESQVSWYW...	CP H RLLGHLER
cabra	AW V WESQVSWYW...	CP H RLLGHLER
oveja	AW V WESQVSWYW...	CP H RLLGHLER
camello	AW V WESQVSWYW...	CP H RLLGHLER
cerdo	AW V WESQVSWYW...	CP H RLLGHLER
perro	AW V WENQVSWYW...	CP Q RLLGHLER
cobaya	AW V WETQVSWYW...	CP Q RLLGHLER
conejo	AW I WESQVSWYW...	CP Q RLLGHLER
rata	AW I WENQVSWYW...	CP E RLLGHLER
ratón	AW M WENQVSWYW...	CP E RLLGHLER
	* * . * * . * * * * *	* * . * * * * * *